

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202391019 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.08.01

(51) Int. Cl. C12N 15/86 (2006.01)  
C12N 15/87 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2021.10.15

(54) КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АДЕНОССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСОВ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

(31) 63/092,179

(32) 2020.10.15

(33) US

(86) PCT/US2021/055243

(87) WO 2022/082017 2022.04.21

(88) 2022.07.21

(71) Заявитель:

ПРЕВЭЙЛ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.  
(US)

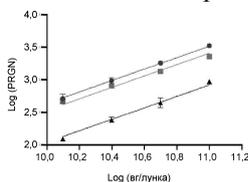
(72) Изобретатель:

Дай Юн, Дэниелс Гарретт, Чэн  
Джонатан, Холлер Джордж, Нельсон  
Стюарт, Чжоу Цзинминь (US)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) В данном документе предложены композиции, содержащие рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), а также рекомбинантные бакуловирусные системы и способы их применения для получения и очистки таких композиций. Также в данном документе предложены анализы для исследования титра и активности таких композиций.



Образец	Относительная активность (по сравнению с партией ПОА)
Образец 1	626%
Образец 2	474%
Образец 3	131%

202391019

A1

A1

202391019

# **КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АДЕНОССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСОВ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ**

## **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 63/092,179, поданной 15 октября 2020 г., содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

## **ОПИСАНИЕ ТЕКСТОВОГО ФАЙЛА, ПРЕДСТАВЛЕННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ**

[0002] Содержимое текстового файла, представленного в электронном виде, полностью включено в данный документ посредством ссылки: Копия перечня последовательностей в машиночитаемом формате (название файла: PRVL\_013\_01WO\_SeqList\_ST25.txt, дата записи: 15 октября 2021 г., размер файла ~16 966 байт).

## **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

[0003] Данное изобретение в целом относится к области генной терапии. Более конкретно, в изобретении предложена рекомбинантная бакуловирусная система и способы ее применения для получения композиций, содержащих рекомбинантные аденоассоциированные вирусы.

## **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

[0004] Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) стал широко использоваться в качестве вектора для генной терапии. Растет потребность в rAAV для исследований на приматах, клинических испытаний на людях и лечения. Рекомбинантные бакуловирусные системы использовали для получения rAAV. Остается потребность в процессах на основе бакуловиров, которые приводят к высоким выходам rAAV с повышенной чистотой, которые подходят для использования в протоколах генной терапии.

## **КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0005] В данном документе предложен способ получения клеточного лизата, включающий:

- (i) получение биореактора, содержащего клетки насекомых, суспендированные в

смеси, содержащей две или более среды для культивирования клеток насекомых, не содержащей сыворотки и/или белков; (ii) заражение клеток насекомых первой популяцией бакуловирусных векторов с множественностью заражения (MOI) около 1,0-2,0, где первая популяция бакуловирусных векторов содержит кассету экспрессии, кодирующую представляющий интерес генный продукт; (iii) заражение клеток насекомых одной или более дополнительными популяциями бакуловирусных векторов с множественностью заражения около 1,0-2,0, где каждая дополнительная популяция содержит кассету экспрессии, кодирующую белок Rep AAV и/или белок Cap AAV; (iv) культивирование инфицированных клеток насекомых в условиях, при которых инфицированные клетки насекомых продуцируют частицы гAAV, кодирующие представляющий интерес ген; и (v) лизис инфицированных клеток насекомых с получением клеточного лизата, содержащего частицы гAAV. В некоторых вариантах осуществления каждая из двух или более сред для культивирования насекомых, не содержащих сыворотки и/или белков, выбрана из среды 4Cell Insect CD, ESF-921, ESF-AF, среды ExpiSf CD, Express Five SFM, baculoGROW, IS SF и SF900 II SFM. В некоторых вариантах осуществления смесь содержит от около 10% об./об. до около 50% об./об. среды SF900 II SFM.

**[0006]** В некоторых вариантах осуществления клетки насекомых на стадии (i) получают после 4-6 пассажей производственного штамма. В некоторых вариантах осуществления заражение на стадии (ii) и заражение на стадии (iii) происходят одновременно.

**[0007]** В некоторых вариантах осуществления клетки насекомых присутствуют в биореакторе при плотности клеток от  $8E+06$  жизнеспособных клеток на мл (жк/мл) до около  $20E+06$  жк/мл.

**[0008]** В некоторых вариантах осуществления культивирование на стадии (iv) происходит в течение от 1 до 5 дней. В некоторых вариантах осуществления лизис на стадии (v) включает приведение инфицированных клеток насекомых в контакт с детергентом.

**[0009]** В некоторых вариантах осуществления способ получения клеточного лизата дополнительно включает стадию осветления клеточного лизата глубинной фильтрацией. В некоторых вариантах осуществления способ получения клеточного лизата дополнительно включает стадию концентрирования частиц гAAV в лизате тангенциальной проточной фильтрацией и/или диафильтрацией.

**[0010]** В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт включает пептид, полипептид, ингибирующую нуклеиновую кислоту или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт включает глюкоцереброзидазу (GCазу), програнулин (PGRN), просапозин (PSAP), C9orf72, триггерный рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках 2 (TREM2),

аполипопротеин E2 (ApoE2) или паркин.

**[0011]** В некоторых вариантах осуществления клеточный лизат содержит частицы гAAV, которые содержат капсидный белок AAV, который представляет собой AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 или вариант любого из вышеперечисленных.

**[0012]** В некоторых вариантах осуществления клеточный лизат содержит (a) от около  $1E+11$  вирусных геномов на миллилитр (вг/мл) до около  $1,0E+13$  вг/мл; (b) от около  $2E+11$  вг/мл до около  $1,0E+13$  вг/мл; или (c) от около  $5E+11$  вг/мл до около  $1,0E+13$  вг/мл.

**[0013]** В данном документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая клеточный лизат, полученный любым из описанных в данном документе способов. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит криопротектор.

**[0014]** В данном документе предложен способ получения терапевтической композиции, включающий: (i) получение клеточного лизата, содержащего частицы гAAV; (ii) приведение в контакт колонки для аффинной хроматографии с клеточным лизатом, при этом аффинная колонка содержит связывающий агент, специфичный для капсидного белка частиц гAAV, в условиях, при которых частицы гAAV связываются с колонкой для аффинной хроматографии; (iii) элюирование связанных частиц гAAV из колонки с получением таким образом первого элюата; (iv) проведение анионообменной хроматографии первого элюата для получения второго элюата, при этом второй элюат содержит меньше пустых частиц гAAV, чем первый элюат; (v) концентрирование второго элюата путем проведения тангенциальной проточной фильтрации с использованием проточного буфера, содержащего трис,  $MgCl_2$ , NaCl и полксамер 188, с получением таким образом терапевтической композиции, содержащей частицы гAAV. В некоторых вариантах осуществления клеточный лизат на стадии (i) получают любым из описанных в данном документе способов получения клеточного лизата. В некоторых вариантах осуществления связывающий агент содержит аффинную смолу, специфичную в отношении капсидного белка AAV9.

**[0015]** В некоторых вариантах осуществления анионообменная хроматография включает смешивание первого элюата с буфером для уравнивания с получением смеси, имеющей проводимость от около  $0,5$  мСм/см до  $5$  мСм/см, необязательно при этом смесь имеет проводимость  $2$  мСм/см, связывание смеси со смолой, содержащей четвертичный амин, для связывания частиц гAAV в смеси со смолой и элюирование частиц гAAV со смолы для получения второго элюата.

**[0016]** В некоторых вариантах осуществления второй элюат концентрируют до от около  $1,0E+12$  вг/мл до около  $1E+14$  вг/мл. В некоторых вариантах осуществления

терапевтическая композиция содержит от около  $1E+13$  вг/мл до около  $1E+14$  вг/мл. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция содержит менее около 15% пустых частиц гAAV.

**[0017]** В данном документе предложена терапевтическая композиция, содержащая частицы гAAV, при этом частица гAAV содержит капсидный белок AAV и кассету экспрессии, кодирующую представляющий интерес генный продукт, при этом терапевтическая композиция содержит более около  $1E+13$  вг/мл частиц гAAV, и при этом терапевтическая композиция содержит менее около 15% пустых частиц гAAV. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт включает пептид, полипептид, ингибирующую нуклеиновую кислоту или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт включает GCазу, GRN, PSAP, TREM2, AроE2 или паркин. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсидный белок AAV, который представляет собой AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 или вариант любого из вышеперечисленных.

**[0018]** В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция содержит от около  $1E+13$  вг/мл до около  $1E+14$  вг/мл.

**[0019]** В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция находится в контейнере. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция является стерильной. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция не способствует росту микробов. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция содержит эндотоксин в количестве менее около 0,5 ЕЭ/мл.

**[0020]** В некоторых вариантах осуществления частица гAAV содержит капсидный белок AAV9.

**[0021]** В некоторых вариантах осуществления более около  $1,0E+13$  вг/мл гAAV содержит генный продукт. В некоторых вариантах осуществления титр TCID<sub>50</sub> гAAV составляет от около 1000 вг/ИЕ до около 6000 вг/ИЕ.

**[0022]** В некоторых вариантах осуществления генный продукт представляет собой GCазу. В некоторых вариантах осуществления активность GCазы составляет по меньшей мере 110% относительно эталонного стандарта, при этом эталонный стандарт представляет собой очищенный гAAV, кодирующий GCАазу.

**[0023]** В некоторых вариантах осуществления инфекционный титр составляет от около  $8,0E+9$  ИЕ/мл до около  $1,2E+10$  ИЕ/мл.

**[0024]** В некоторых вариантах осуществления осмоляльность составляет от около 300 мОсм/кг до около 500 мОсм/кг. В некоторых вариантах осуществления pH составляет от около 7 до около 9.

[0025] В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция не содержит видимых частиц. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция содержит менее около 6000 частиц размером более около 10 мкм на контейнер и менее около 600 частиц размером более около 25 мкм на контейнер. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция содержит менее или около 3% агрегатов.

[0026] В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция содержит общий белок в количестве от около 300 мкг/мл до около 1000 мкг/мл.

[0027] В некоторых вариантах осуществления чистота гAAV составляет более около 90% об./об.

[0028] В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция не содержит какой-либо единичной примеси в количестве больше около 5% об./об. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция содержит от около 0,0007% до около 0,0012% плуроника. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция содержит менее около  $5,5 \times 10^4$  копий РНК/мл рабдовируса.

[0029] В некоторых вариантах осуществления экстрагируемый объем терапевтической композиции в контейнере равен или больше около 1,0 мл.

## **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

[0030] На Фиг. 1 представлена схема планшета ПЦР для анализа активности гAAV. «RS» означает «эталонный стандарт». «TS» означает «исследуемый образец».

[0031] На Фиг. 2 представлен линейный график и расчеты относительной активности нескольких образцов гAAV, экспрессирующих GCase.

[0032] На Фиг. 3 представлен линейный график и расчеты относительной активности нескольких образцов гAAV, экспрессирующих PGRN.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0033] Данное изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим гAAV с высоким выходом и достаточной чистотой, которые подходят для введения в протоколах генной терапии. Изобретение также относится к способам применения рекомбинантных бакуловирусных систем для получения композиций, содержащих гAAV, с высоким выходом и высокой чистотой.

[0034] Термин «рекомбинантный вирус» относится к вирусу, который был генетически изменен, *например*, путем добавления или вставки конструкции гетерологичной нуклеиновой кислоты в вирусную частицу.

**[0035]** 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.

**[0036]** Термин «рекомбинантный аденоассоциированный вирус» или «гAAV» относится к частице AAV или вириону AAV, содержащему вектор гAAV, инкапсулированный одним или несколькими капсидными белками AAV.

**[0037]** 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.

**[0038]** Термин «полная частица гAAV» или «полный капсид гAAV» относится к вириону AAV, который содержит структурную белковую оболочку AAV, инкапсулирующую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую представляющий интерес экзогенный ген, фланкированная с обеих сторон ITR AAV.

**[0039]** Термин «пустая частица гAAV» или «пустой капсид гAAV» относится к вириону AAV, который содержит структурную белковую оболочку AAV, но в котором полностью или частично отсутствует полинуклеотидная конструкция, содержащая представляющий интерес экзогенный ген, фланкированная с обеих сторон ITR AAV. Пустая частица гAAV не выполняет функцию переноса представляющего интерес гена в клетку-хозяина.

**[0040]** В некоторых вариантах осуществления термин «элюент» относится к буферу, используемому для элюирования вещества. В некоторых вариантах осуществления термин «элюент» можно понять в контексте как относящийся к элюируемому веществу, *например*, желаемому продукту или веществу с предыдущей стадии очистки, *например*, для анализа или дальнейшей очистки.

**[0041]** Термин «эталонный стандарт» относится к композиции, содержащей вектор AAV, кодирующий представляющий интерес экзогенный белок, концентрация и/или активность которого известны.

**[0042]** Термин «ИЕ» относится к инфекционным единицам.

**[0043]** Термин «ТСID<sub>50</sub>» относится к инфекционной дозе для 50% клеточной культуры.

[0044] Термин «USP» относится к Фармакопее США.

**Терапевтические композиции, содержащие рекомбинантный аденоассоциированный вирус**

[0045] В данном документе предложены терапевтические композиции, содержащие гAAV. В некоторых аспектах терапевтические композиции, предложенные в данном документе, подходят для генной терапии.

[0046] В некоторых аспектах в данном документе предложена терапевтическая композиция, содержащая частицы гAAV, при этом частица гAAV содержит капсидный белок AAV и кассету экспрессии, кодирующую представляющий интерес генный продукт, при этом терапевтическая композиция содержит более  $1E+13$  вг/мл частиц гAAV, и при этом терапевтическая композиция содержит менее 15% пустых частиц гAAV.

[0047] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт включает пептид, полипептид, ингибирующую нуклеиновую кислоту или их комбинацию.

[0048] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой Gсазу человека или програнулин (PGRN или GRN) человека. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой PSAP человека, C9orf72 человека, TREM2 человека, ApoE2 человека или паркин человека.

[0049] В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой ингибирующую РНК. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой двухцепочечную РНК (дцРНК), миРНК, микро РНК (микроРНК), искусственную микроРНК (amiРНК; англ.: artificial miRNA), короткую шпилечную РНК (кшРНК) или РНК-аптамер. Искусственная микроРНК (amiРНК) может быть получена путем модификации нативной микроРНК для замены естественных областей-мишеней пре-мРНК представляющей интерес областью-мишенью. Например, встречающаяся в природе экспрессируемая микроРНК может использоваться в качестве каркаса или остова (*например*, каркаса перв-микроРНК), при этом стеблевую последовательность заменяют последовательностью микроРНК, нацеленной на представляющий интерес ген. Искусственный предшественник микроРНК (пре-amiРНК) обычно обрабатывают таким образом, что предпочтительно образуется одна единственная стабильная малая РНК. В некоторых вариантах осуществления векторы scAAV и scAAV, описанные в данном документе, содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую amiРНК. В некоторых вариантах осуществления каркас перв-миРНК в amiРНК получен из перв-миРНК, выбранной из группы, состоящей из перв-MIR-21, перв-MIR-22, перв-MIR-26a,

перв-MIR-30a, перв-MIR-33, перв-MIR-122, перв-MIR-375, перв-MIR-199, перв-MIR-99, перв-MIR-194, перв-MIR-155, перв-MIR-451. В некоторых вариантах осуществления amiPHK содержит каркас amiPHK eSIBR, например, как описано в Fowler *et al.* (2016) *Nucleic Acids Res.* 44(5):e48. В некоторых вариантах осуществления amiPHK содержит каркас miR-7-2.

**[0050]** В некоторых вариантах осуществления ингибирующая РНК нацелена на  $\alpha$ -синуклеин человека, атаксин 2 человека (ATXN2), связанный с микротрубочками тау-белок человека (МАРТ) или аполипопротеин Е человека (АроЕ). В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV содержит полинуклеотид, кодирующий GСазу человека (*например*, SEQ ID NO: 2), и полинуклеотид, кодирующий ингибирующую РНК, нацеленную на  $\alpha$ -синуклеин человека. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий ингибирующую РНК, нацеленную на  $\alpha$ -синуклеин человека, содержит SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV содержит полинуклеотид, кодирующий C9orf72 человека (*т.е.* функциональный C9orf72), и полинуклеотид, кодирующий ингибирующую РНК, нацеленную на C9orf72 человека. В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV содержит полинуклеотид, кодирующий АроЕ2 человека (*т.е.* функциональный АроЕ2), и полинуклеотид, кодирующий ингибирующую РНК, нацеленную на АроЕ человека. В некоторых вариантах осуществления одна молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотид, кодирующий экзогенный белок, и полинуклеотид, кодирующий ингибирующую РНК. В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV содержит полинуклеотид, кодирующий TREM2 человека (*т.е.* функциональный TREM2), и полинуклеотид, кодирующий ингибирующую РНК, нацеленную на TREM2 человека.

**[0051]** Примеры подходящих векторов гAAV, которые можно использовать в композициях и 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.

**[0052]** В некоторых вариантах осуществления терапевтических композиций, 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.

**[0053]** В некоторых вариантах осуществления терапевтических композиций, 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: 5). В некоторых вариантах осуществления каждый ITR получен из ITR AAV2 дикого типа.

**[0054]** В некоторых вариантах осуществления терапевтических композиций, описанных в данном документе, вектор гAAV содержит в последовательном порядке первый ITR AAV, энхансер ЦМВ, промотор СВА, полинуклеотид, кодирующий белок GСазы человека, WPRE, сигнальный хвост полиА бычьего гормона роста и второй AAV ITR. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий белок GСазы человека, является кодон-оптимизированным (*например*, кодон-оптимизированным для экспрессии в клетках человека). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий белок GСазы человека, содержит SEQ ID NO: 2.

**[0055]** В некоторых вариантах осуществления терапевтических композиций, описанных в данном документе, вектор гAAV содержит в последовательном порядке первый ITR AAV, энхансер ЦМВ, промотор СВА, полинуклеотид, кодирующий белок PGRN человека, WPRE, сигнальный хвост полиА бычьего гормона роста и второй AAV ITR. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий белок PGRN человека, является кодон-оптимизированным (*например*, кодон-оптимизированным для экспрессии в клетках человека). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий белок PGRN человека, содержит SEQ ID NO: 4.

**[0056]** В некоторых вариантах осуществления терапевтических композиций, описанных в данном документе, вектор гAAV представляет собой самокомплементарный вектор рекомбинантного аденоассоциированного вируса (scAAV). Векторы scAAV описаны, например, в McCarty *et al.* (2001) *Gene Ther.* 8(16):1248-54.

**[0057]** В некоторых вариантах осуществления терапевтических композиций, описанных в данном документе, гAAV содержит капсидный белок AAV9. В некоторых вариантах осуществления композиций, описанных в данном документе, гAAV содержит капсидный белок AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 или AAV11 или вариант любого из этих капсидных белков.

**[0058]** Титр генома (также называемый физическим титром) векторов гAAV, *например*, в композициях и составах, описанных в данном документе, можно определить несколькими

способами. ПЦР с праймерами, специфичными для вирусного вектора, может обеспечить относительные измерения. Количественная ПЦР (кПЦР) может использоваться для небольших образцов и абсолютных измерений. Капельная цифровая ПЦР (кцПЦР) — это метод цифровой ПЦР, основанный на технологии капель эмульсии вода-масло. Образец фракционируют на десятки тысяч капель, и в каждой отдельной капле происходит ПЦР-амплификация молекул матрицы. Не нужно делать стандартную кривую или иметь праймеры с высокой эффективностью амплификации, поэтому для кцПЦР обычно не используют столько образцов, сколько в традиционных методах на основе ПЦР. В некоторых вариантах осуществления титр генома вирусного вектора определяют с помощью ПЦР. В некоторых вариантах осуществления титр генома вирусного вектора определяют с помощью кПЦР. В некоторых вариантах осуществления титр генома вирусного вектора определяют с помощью кцПЦР. Способ определения титра вирусного генома с помощью кцПЦР описан, например, в Lock *et al.* (2014) *Hum Gene Ther Methods* 25(2):115-25. В некоторых вариантах осуществления титр генома вирусного вектора определяют с использованием способа, представленного в Примере 11 или Примере 13. В некоторых вариантах осуществления физический титр терапевтической композиции больше или равен около  $2,0 \times 10^{13}$  вг/мл, около  $3,0 \times 10^{13}$  вг/мл, около  $4,0 \times 10^{13}$  вг/мл или около  $5,0 \times 10^{13}$  вг/мл. В некоторых вариантах осуществления физический титр терапевтической композиции составляет от около  $2,0 \times 10^{13}$  вг/мл до около  $5,0 \times 10^{13}$  вг/мл. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция содержит более  $1E+13$  вг/мл частиц гAAV. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция содержит от около  $1E+13$  вг/мл до около  $1E+14$  вг/мл частиц гAAV.

**[0059]** Инфекционный титр (также называемый функциональным титром) векторов гAAV, *например*, в композициях и составах, описанных в данном документе, представляет собой концентрацию вирусных частиц, которые могут инфицировать клетки. В некоторых вариантах осуществления инфекционный титр определяют с помощью анализа клеточной трансдукции. В некоторых вариантах осуществления инфекционный титр вирусного вектора определяют с использованием способа, представленного в Примере 12 или Примере 14. В некоторых вариантах осуществления инфекционный титр композиции, описанной в 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 TCID<sub>50</sub> композиции, описанной в данном документе, составляет от около

4500 вг/ИЕ до около 10000 вг/ИЕ. В некоторых вариантах осуществления титр TCID<sub>50</sub> композиции, описанной в данном документе, составляет от около 1000 вг/ИЕ до около 6000 вг/ИЕ. В некоторых вариантах осуществления TCID<sub>50</sub> 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.

**[0060]** В некоторых вариантах осуществления способы на основе ПЦР обнаруживают и количественно определяют инкапсулированные геномы гAAV с использованием специально разработанных праймеров и зондов, нацеленных на экзогенный ген. В некоторых вариантах осуществления способы на основе ПЦР обнаруживают и количественно определяют инкапсулированные геномы гAAV с использованием специально разработанных праймеров и зондов, нацеленных на промотор СВА. В некоторых вариантах осуществления способы на основе ПЦР обнаруживают и количественно определяют инкапсулированные геномы гAAV с использованием специально разработанных праймеров и зондов, нацеленных на энхансер ЦМВ. В некоторых вариантах осуществления способы на основе ПЦР обнаруживают и количественно определяют инкапсулированные геномы гAAV с использованием специально разработанных праймеров и зондов, нацеленных на последовательности ITR. В некоторых вариантах осуществления способы на основе ПЦР обнаруживают и количественно определяют инкапсулированные геномы гAAV с использованием специально разработанных праймеров и зондов, нацеленных на сигнальный хвост полиаденилирования (полиА) бычьего гормона роста.

**[0061]** В некоторых случаях в процессе получения композиций, содержащих гAAV, могут образовываться композиции, содержащие примеси. Фармацевтические композиции, содержащие небольшое количество примесей, могут иметь преимущество, поскольку они позволяют избежать воздействия антигенного материала (*например*, пустых капсидов, белка клетки-хозяина, ДНК клетки-хозяина) на субъектов (*например*, младенцев) с незрелой или ослабленной иммунной системой без терапевтической пользы. В некоторых вариантах осуществления такие фармацевтические композиции могут снижать потенциальные инфузионные реакции или более широкие иммунные ответы и могут повышать терапевтическую эффективность.

**[0062]** В некоторых вариантах осуществления в процессе получения AAV могут образовываться пустые частицы гAAV (также называемые «пустыми капсидами»), которые не содержат материала нуклеиновой кислоты. По сравнению с полными вирусными

частицами с векторным материалом гAAV, пустые частицы имеют разную плотность, что позволяет разделить два вида способами, известными в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления пустые капсиды разделяют хроматографией (*например*, монолитной хроматографией или, более конкретно, монолитной хроматографией с конвективным взаимодействием сред).

**[0063]** В некоторых вариантах осуществления соотношение пустых частиц гAAV к полным частицам гAAV можно измерить стандартными лабораторными методами. В некоторых вариантах осуществления соотношение измеряют с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). В некоторых вариантах осуществления соотношение измеряют с помощью измерений оптического поглощения. В некоторых вариантах осуществления соотношение измеряют с помощью измерений УФ-поглощения.

**[0064]** В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция, описанная в данном документе, содержит менее около 15% пустых частиц гAAV. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция содержит менее около 10 %, менее около 8 % пустых частиц гAAV, менее 7 %, менее около 5 %, менее около 3 % или менее около 1 % пустых частиц гAAV. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция содержит от около 1% до около 10% пустых частиц гAAV. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция содержит от около 2% до около 8% пустых частиц гAAV. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция содержит менее или около 6% пустых частиц гAAV, около 5% пустых частиц гAAV, около 4% пустых частиц гAAV, около 3% пустых частиц гAAV, около 2% пустых частиц гAAV или около 1% пустых частиц гAAV. В некоторых вариантах осуществления количество пустых частиц гAAV находится ниже предела обнаружения. В некоторых вариантах осуществления процент пустых частиц гAAV определяют как процент от общего количества частиц гAAV, *например*, с использованием аналитического ультрацентрифугирования (AUC). В некоторых вариантах осуществления такой низкий процент пустых частиц гAAV повышает эффективность лечения и/или снижает нежелательные явления (*например*, воспалительные реакции, повреждение печени) после введения субъекту, *например*, по сравнению с введением композиций, содержащих более высокий процент пустых частиц гAAV. В некоторых вариантах осуществления способы получения композиций гAAV, описанные в данном документе, обеспечивают такое низкое процентное содержание пустых частиц гAAV по сравнению с количествами пустых частиц гAAV, полученными другими способами, *например*, теми, которые не используют способы получения и/или очистки, описанные в данном документе.

**[0065]** В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция, описанная в

данном документе, содержит по меньшей мере 80% полных частиц гAAV. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция содержит по меньшей мере 85 % полных частиц гAAV, по меньшей мере 90 % полных частиц гAAV или по меньшей мере 95 % полных частиц гAAV.

**[0066]** В некоторых вариантах осуществления в процессе получения композиций гAAV остаточный белок из клеток насекомых (*например*, клеток Sf9), используемый для получения частиц гAAV, может быть отделен не полностью. Остаточные белки клетки-хозяина потенциально могут вызвать иммунный ответ у субъекта, принимающего генную терапию. Количество остаточного белка клетки-хозяина можно измерить с помощью любых стандартных лабораторных методов, позволяющих различать белки вирусного капсида и остаточные белки клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления количество остаточных белков клетки-хозяина можно измерить с помощью эксклюзионной или ионообменной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления измерение количества остаточных белков клетки-хозяина можно измерить с помощью вестерн-блоттинга с антителами, специфичными к исходным клеткам. В некоторых вариантах осуществления количество остаточного белка клетки-хозяина можно измерить с помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА). В некоторых вариантах осуществления количество остаточного белка клетки-хозяина можно измерить с помощью коммерческого набора для ИФА.

**[0067]** В некоторых вариантах осуществления остаточный белок клетки-хозяина в терапевтической композиции, описанной в данном документе, меньше или равен около 45 нг/1E+13 вг, 42 нг/1E+13 вг, 40 нг/1E+13 вг, 35 нг/1E+13 вг, 30 нг/1E+13 вг, около 29 нг/1E+13 вг, около 28 нг/1E+13 вг, около 27 нг/1E+13 вг, около 26 нг/1E+13 вг или около 25 нг/1E+13 вг.

**[0068]** В некоторых случаях в процессе получения композиций гAAV остаточная ДНК клетки-хозяина из клеток насекомых (*например*, клеток Sf9) или остаточная бакуловирусная ДНК или бакмидная ДНК, используемые для получения векторов гAAV, могут быть удалены не полностью. Процессы очистки (*например*, осветление, тангенциальная поточная фильтрация и т. д.) могут удалить большую часть остаточной ДНК клетки-хозяина или бакуловирусной ДНК. В некоторых вариантах осуществления измерение количества остаточной ДНК клетки-хозяина или бакуловирусной ДНК проводят с помощью ПЦР (полимеразной цепной реакции). В некоторых вариантах осуществления измерение количества остаточной ДНК клетки-хозяина или бакуловирусной ДНК проводят с помощью кПЦР с праймерами, специфичными для последовательностей клетки-хозяина или бакуловируса. В некоторых вариантах осуществления измерение количества

остаточной ДНК клетки-хозяина или бакуловирусной ДНК проводят с помощью кцПЦР. В некоторых вариантах осуществления количество бакуловирусной или бакмидной ДНК определяют с помощью кПЦР с праймерами, специфичными к области гена устойчивости к антибиотикам бакмиды. В некоторых вариантах осуществления количество остаточной ДНК клетки-хозяина определяют с помощью коммерческих наборов для кПЦР. Уменьшение количества остаточной ДНК клетки-хозяина или бакуловирусной или бакмидной ДНК может улучшить терапевтические результаты, и такие композиции могут быть очищены и/или выбраны для применения в способах лечения, описанных в данном документе.

**[0069]** В некоторых вариантах осуществления количество остаточной ДНК клетки-хозяина в фармацевтической композиции, описанной в данном документе, меньше или равно около  $1E+03$  пг/мл на  $1E+14$  вг/мл. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит менее или около 1,3 нг остаточного белка клетки-хозяина на  $1E+14$  вг/мл. В некоторых вариантах осуществления количество остаточной ДНК клетки-хозяина в фармацевтической композиции, описанной в данном документе, ниже предела количественного определения.

**[0070]** В некоторых вариантах осуществления терапевтические композиции, описанные в данном документе, содержащие любую из вирусных частиц, описанных в данном документе, сохраняют активность в пределах  $\pm 20\%$ , в пределах  $\pm 15\%$ , в пределах  $\pm 10\%$  или в пределах  $\pm 5\%$  от эталонного стандарта. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция, описанная в данном документе, содержит вирусный вектор, при этом 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 активность измеряют с использованием подходящего клеточного анализа *in vitro* или модели на животных *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления активность или % функционального гAAV, кодирующего Gсазу человека, можно определить с помощью клеточного анализа с использованием флуорогенного субстрата резорифин- $\beta$ -D-глюкопиранозид, как описано ниже. В некоторых вариантах осуществления активность или % функционального гAAV, кодирующего програнулин человека, можно определить с помощью клеточного анализа с использованием ИФА, как

описано ниже.

**[0071]** В некоторых вариантах осуществления терапевтические композиции, описанные в данном документе, могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества для приближения к физиологическим условиям, такие как регулирующие pH и буферные агенты, регулирующие тоничность агенты, смачивающие агенты и тому подобное, например, ацетат натрия, лактат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, монолаурат сорбитана *т.д.* В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит консервант. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция не содержит консервант.

**[0072]** Композиции гAAV, описанные в данном документе, могут быть составлены для получения фармацевтически полезных композиций. Композиции по данному изобретению могут быть составлены для введения субъекту-млекопитающему, *например* человеку, с использованием методов, известных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления композиции гAAV могут быть составлены для инъекции в мостомозжечковую цистерну. В некоторых вариантах осуществления композиции гAAV могут быть составлены для внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления композиции гAAV могут быть составлены для внутримышечного, внутрикожного, слизистого, подкожного, интратекального или местного введения.

**[0073]** Кроме того, в данном документе предложен фармацевтический состав, содержащий: (a) частицу гAAV, содержащую вектор гAAV, содержащий полинуклеотид, кодирующий белок GCазы человека; (b) трис-буфер; (c) хлорид магния; (d) хлорид натрия; и (e) полуксамер. В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV содержит в последовательном порядке первый ITR AAV, энхансер ЦМВ, промотор СВА, полинуклеотид, кодирующий белок GCазы человека, WPRE, сигнальный хвост полиА бычьего гормона роста и второй AAV ITR. 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, кодирующий белок GCазы человека, называется PR001.

**[0074]** Кроме того, в данном документе предложен фармацевтический состав, содержащий частицу гAAV, около 20 mM Трис, pH 8,0, около 1 mM хлорида магния, около 200 mM хлорида натрия и около 0,001% полуксамера 188, при этом гAAV содержит вектор гAAV, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок глюкоцереброзидазы человека, при этом белок глюкоцереброзидазы человека кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 2; и при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок глюкоцереброзидазы человека, фланкирована

двумя последовательностями ITR AAV. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV представляет собой частицу AAV9.

**[0075]** Кроме того, в данном документе предложен фармацевтический состав, содержащий: (a) частицу гAAV, содержащую вектор гAAV, содержащий полинуклеотид, кодирующий белок програнулин человека (PGRN); (b) трис-буфер; (c) хлорид магния; (d) хлорид натрия; и (e) полоксамер. В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV содержит в последовательном порядке первый ITR AAV, энхансер ЦМВ, промотор СВА, полинуклеотид, кодирующий белок PGRN человека, WPRE, сигнальный хвост полиА бычьего гормона роста и второй ITR AAV. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий белок PGRN человека, содержит SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV, содержащая вектор гAAV, содержащий полинуклеотид, кодирующий белок PGRN человека, называется PR006.

**[0076]** Кроме того, в данном документе предложен фармацевтический состав, содержащий частицу гAAV, около 20 mM Трис, pH 8,0, около 1 mM хлорида магния, около 200 mM хлорида натрия и около 0,001% полоксамера 188, при этом гAAV содержит вектор гAAV, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок програнулин человека, при этом белок програнулин человека кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 4; и при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок програнулин человека, фланкирована двумя последовательностями ITR AAV. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV представляет собой частицу AAV9.

**[0077]** В некоторых вариантах осуществления состав, описанный в данном документе, содержит от около 10 mM до около 30 mM Трис, pH 8,0. В некоторых вариантах осуществления состав, описанный в данном документе, содержит от около 0,5 mM до около 1,5 mM хлорида магния. В некоторых вариантах осуществления состав, описанный в данном документе, содержит от около 100 mM до около 300 mM хлорида натрия. В некоторых вариантах осуществления состав, описанный в данном документе, содержит от около 0,001% до около 0,005% полоксамера 188. В некоторых вариантах осуществления состав, описанный в данном документе, содержит от около  $1E+13$  вг/мл до около  $5E+13$  вг/мл.

**[0078]** В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция, описанная в данном документе, имеет общее количество аэробных микроорганизмов (ТАМС; англ.: total aerobic microbial count)  $\leq 1$  КОЕ/10 мл и общее комбинированное количество дрожжей и плесени (ТУМС; англ.: total combined yeast and mold count)  $\leq 1$  КОЕ/10 мл. Количества ТАМС и ТУМС могут быть измерены методом мембранной фильтрации USP <61>.

**[0079]** В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, содержит эндотоксин в количестве менее около 0,5 ЕЭ/мл, менее около 0,4 ЕЭ/мл, менее около 0,3 ЕЭ/мл, менее около 0,2 ЕЭ/мл или менее около 0,1 ЕЭ/мл. Количество эндотоксина можно измерить кинетически-хромогенным методом.

**[0080]** В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе композиция не содержит микоплазмы и спироплазмы. Наличие микоплазмы и спироплазмы можно определить с помощью теста на микоплазму с микоплазмастазом (англи.: *Mycoplasma*stasis) (USP <63>).

**[0081]** В некоторых вариантах осуществления в композиции, описанной в данном документе, не обнаруживают посторонние агенты. Наличие вирусных контаминантов можно определить *in vitro* путем прямой инокуляции в три клеточные линии: клетки MRC-5, Vero и Hela. Присутствие вирусных контаминантов можно определить *in vivo* путем инокуляции взрослым мышам, морским свинкам, новорожденным мышам и куриным яйцам с эмбрионами.

**[0082]** В некоторых вариантах осуществления репликационно-компетентный AAV не обнаруживают в композиции, описанной в данном документе. Наличие репликационно-компетентного AAV может быть определено путем серийного заражения и кПЦР.

**[0083]** В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, имеет чистоту > около 90% без единичных примесей > около 2%. В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, имеет чистоту выше около 90%, около 95% или около 99%. В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, не содержит какой-либо единичной примеси в количестве, превышающем около 5% об./об., около 4% об./об., около 3% об./об. или около 2% об./об. Чистоту можно определить с помощью ДСН-ПААГ SYPRO<sup>®</sup> Ruby.

**[0084]** В некоторых вариантах осуществления присутствие остаточного Тритон X-100 в композиции, описанной в данном документе, определяют с помощью ВЭЖХ-RI или поглощения УФ-света.

**[0085]** В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, содержит менее 1,7 нг/  $1 \times 10^{13}$  вг, менее 1,67 нг/ $1 \times 10^{13}$  вг, менее 1,6 нг/ $1 \times 10^{13}$  вг или менее 1,5 нг/ $1 \times 10^{13}$  вг остаточной бензоазы. Количество остаточной бензоазы можно измерить с помощью ИФА.

**[0086]** В некоторых вариантах осуществления присутствие остаточного бакуловируса в композиции, описанной в данном документе, определяют с помощью анализа VacPAK<sup>™</sup>.

**[0087]** В некоторых вариантах осуществления присутствие остаточной ДНК клетки-хозяина SF9 в композиции, описанной в данном документе, определяют с помощью кПЦР.

**[0088]** В некоторых вариантах осуществления присутствие остаточного белка клетки-хозяина SF9 в композиции, описанной в данном документе, определяют с помощью ИФА.

**[0089]** В некоторых вариантах осуществления композиция, описанной в данном документе, не содержит нодавируса. Наличие нодавируса можно определить с помощью кПЦР.

**[0090]** В некоторых вариантах осуществления в композиции, описанной в данном документе, ДНК микобактерий не обнаружена. Присутствие микобактериальной ДНК можно определить с помощью кПЦР.

**[0091]** В некоторых вариантах осуществления композицию, описанную в данном документе, тестируют на стерильность с помощью мембранной фильтрации USP<71>. В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, не демонстрирует роста в этом тесте.

**[0092]** В некоторых вариантах осуществления композицию, описанную в данном документе, тестируют на бактериостаз/фунгистаза (англ.: Bacteriostasis/Fungistasis) в соответствии с USP<71>. В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, не демонстрирует ингибирования роста в этом тесте.

**[0093]** В некоторых вариантах осуществления композицию, описанную в данном документе, тестируют на наличие капсида AAV9 с помощью специфичного к AAV9 ИФА.

**[0094]** В некоторых вариантах осуществления композицию, описанную в данном документе, тестируют на наличие капсидного белка AAV с помощью вестерн-блоттинга на белок вирусных частиц.

**[0095]** В некоторых вариантах осуществления композицию, описанную в данном документе, тестируют на идентичность ДНК с помощью секвенирования следующего поколения.

**[0096]** В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, имеет осмоляльность от около 300 мОсм/кг до около 500 мОсм/кг. В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, имеет осмоляльность от около 388 мОсм/кг до около 426 мОсм/кг. Осмоляльность можно измерить методом понижения точки замерзания.

**[0097]** В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, имеет pH от около 7 до около 9. В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, имеет pH  $8,0 \pm 0,5$ . pH можно измерить с помощью pH-метра.

**[0098]** В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, имеет цвет от прозрачного до слегка непрозрачного, представляет собой раствор от бесцветного до бледно-белого и не содержит видимых частиц, что определяется при

визуальном осмотре.

**[0099]** В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, содержит около 6000 частиц/контейнер  $\geq 10$  мкм и  $\leq$  около 600 частиц/контейнер  $\geq 25$  мкм. Субвидимые твердые частицы могут быть измерены методом USP<787>.

**[0100]** В некоторых вариантах осуществления композицию, описанную в данном документе, тестируют на агрегаты с помощью динамического рассеяния света (DLS).

**[0101]** В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе композиция содержит общий белок в количестве от около 300 мкг/мл до около 1000 мкг/мл. Количество общего белка можно измерить с помощью набора для анализа белка Micro BCA™.

**[0102]** В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция, описанная в данном документе, находится в контейнере. В некоторых вариантах осуществления укупорку контейнера проверяют испытанием на проникновение красителя. В некоторых вариантах осуществления экстрагируемый объем композиции в контейнере составляет по меньшей мере около 1,0 мл.

**[0103]** В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, содержит от около 0,0007% до около 0,0012% плуроника.

**[0104]** В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, содержит менее около  $5,5 \times 10^4$  копий РНК/мл рабдовируса.

**[0105]** В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция, описанная в данном документе, имеет один или несколько из следующих параметров: ТАМС  $\leq 1$  КОЕ/10 мл; ТУМС  $\leq 1$  КОЕ/10 мл; содержит количество эндотоксина  $\leq 5$  ЕЭ/мл; имеет отрицательный результат на наличие микоплазмы и спироплазмы; отсутствие признаков заражения посторонними вирусными агентами; имеет физический титр  $\geq 3,0 \times 10^{13}$  вг/мл; отсутствие обнаруживаемого репликативно-компетентного AAV; имеет чистоту  $>90\%$  без единичных примесей  $>2\%$ ; имеет остаточную бензоназу  $<1,67$  нг/1х10<sup>13</sup> вг; имеет  $\leq 15\%$  пустых капсидов; имеет  $<42$  нг/1х10<sup>13</sup> вг остаточного белка клетки-хозяина Sf9; имеет отрицательный результат на нодавирус; и ДНК микобактерий не обнаружена.

**[0106]** В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция, описанная в данном документе, имеет один или несколько из следующих параметров: отсутствие роста в тесте на стерильность; содержит количество эндотоксина  $\leq 5$  ЕЭ/мл; имеет положительный результат на капсидный белок AAV9; содержит ожидаемую последовательность ДНК; содержит  $\geq 3,0 \times 10^{13}$  вг/мл; имеет чистоту  $>90\%$  без единичных примесей  $>2\%$ ; имеет осмоляльность от около 388 мОсм/кг до около 426 мОсм/кг; имеет рН 8,0 +/- 0,5; прозрачный или слегка непрозрачный; раствор от бесцветного до бледно-белого; не содержит видимых частиц, что определяется при визуальном осмотре; содержит 6000

частиц/контейнер  $\geq 10$  мкм и  $\leq 600$  частиц/контейнер  $\geq 25$  мкм; и содержит экстрагируемый объем в контейнере  $\geq 1,0$  мл.

[0107] В некоторых вариантах осуществления композиции и составы, содержащие гAAV, описанные в данном документе, могут применяться для лечения заболеваний, связанных с aberrантной лизосомальной функцией. В некоторых вариантах осуществления композиции и составы, содержащие гAAV, описанные в данном документе, могут применяться для лечения нейродегенеративных расстройств или заболеваний. В некоторых вариантах осуществления для лечения болезни Гоше или болезни Паркинсона (*например*, болезни Паркинсона с мутацией *GBA1*) субъекту можно вводить композицию или состав, описанные в данном документе, содержащие гAAV, содержащий вектор гAAV, кодирующий белок GCase человека. В некоторых вариантах осуществления для лечения лобно-височной деменции с мутацией *GRN* (FTD-GRN) субъекту можно вводить композицию или состав, описанные в данном документе, содержащие гAAV, содержащий вектор гAAV, кодирующий белок програнулин человека. В некоторых вариантах осуществления для лечения синуклеинопатии или паркинсонизма субъекту можно вводить композицию или состав, описанные в данном документе, содержащие гAAV, содержащий вектор гAAV, кодирующий белок глюкоцереброзидазы человека, и полинуклеотид, кодирующий ингибирующую РНК, нацеленную на  $\alpha$ -синуклеин человека. В некоторых вариантах осуществления для лечения синуклеинопатии или паркинсонизма субъекту можно вводить композицию или состав, описанные в данном документе, содержащие гAAV, содержащий вектор гAAV, содержащий полинуклеотид, кодирующий ингибирующую РНК, нацеленную на  $\alpha$ -синуклеин человека.

### **Рекомбинантные бакуловирусы**

[0108] Способы по данному изобретению включают совместное заражение клеток насекомых популяциями рекомбинантных бакуловирусов (гBV; англ.: recombinant baculoviruse) с получением гAAV, кодирующего представляющий интерес ген (также называемый экзогенным геном). В способах по данному изобретению можно использовать по меньшей мере две популяции гBV. Способы создания рекомбинантного бакуловируса известны в данной области техники (*см.*, *например*, систему экспрессии бакуловирусов Bac-to-Bac<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA)).

[0109] В некоторых аспектах геном гBV получен из мультикапсидного нуклеополиэдровируса *Autographa californica* (AcMNPV), вируса ядерного полиэдроза *Bombyx mori* (BmNPV), *Helicoverpa armigera* (HearNPV) или *Spodoptera exigua* (MNPV). В некоторых вариантах осуществления геном гBV получен из клона С6 AcMNPV.

**[0110]** Первая популяция векторов gBV может содержать геном gBV, содержащий каскету экспрессии, содержащую представляющий интерес экзогенный ген (GOI) и соответствующие регуляторные последовательности. Этот gBV может называться «gBV GOI». В некоторых вариантах осуществления геном gBV содержит каскету экспрессии, содержащую: (1) полинуклеотид, кодирующий экзогенный белок, (2) полинуклеотид, кодирующий ингибирующую РНК, или (3) полинуклеотид, кодирующий экзогенный белок, и полинуклеотид, кодирующий ингибирующую РНК. Каскета экспрессии фланкирована двумя ITR AAV. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один ITR представляет собой ITR AAV2 (*например*, ITR AAV2 дикого типа (SEQ ID NO: 5)). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один ITR получен из ITR AAV2 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления GOI представляет собой ген, кодирующий GCase человека, PGRN человека, PSAP человека, C9orf72 человека, TREM2 человека, ApoE2 человека или паркин человека. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая РНК нацелена на  $\alpha$ -синуклеин человека, ATXN2 человека, MAPP1 человека или ApoE человека. В некоторых вариантах осуществления геном gBV содержит полинуклеотид, кодирующий GCase человека (*например*, SEQ ID NO: 2) и полинуклеотид, кодирующий ингибирующую РНК, нацеленную на  $\alpha$ -синуклеин человека (*например*, SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах осуществления геном gBV содержит полинуклеотид, кодирующий C9orf72 человека (*т.е.* функциональный C9orf72), и полинуклеотид, кодирующий ингибирующую РНК, нацеленную на C9orf72 человека. В некоторых вариантах осуществления геном gBV содержит полинуклеотид, кодирующий ApoE2 человека (*т.е.* функциональный ApoE2), и полинуклеотид, кодирующий ингибирующую РНК, нацеленную на ApoE человека. Примеры подходящих полинуклеотидных последовательностей для включения в геном gBV 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.

**[0111]** В некоторых аспектах геном gBV, используемый в способах, описанных в данном документе, содержит ген *GBA1* человека, который кодирует GCase. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая GCase, является кодон-оптимизированной (*например*, кодон-оптимизированной для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека). В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая GCase, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (*например*, эталонную последовательность NCBI NP\_000148.2). В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая GCase, содержит последовательность SEQ

ID NO: 2. В некоторых аспектах геном гBV, используемый в способах, описанных в данном документе, содержит ген *GBA1* человека и дополнительно содержит сигнальный хвост полиА бычьего гормона роста (bGH), WPRE, промотор куриного бета-актина (CBAp), энхансер цитомегаловируса (CMVe), искусственный интрон или искусственный экзон, или любую комбинацию таких последовательностей.

**[0112]** В некоторых аспектах геном гBV, используемый в способах, описанных в данном документе, содержит ген *PGRN* человека (также известный как ген *GRN*), который кодирует PGRN. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая PGRN, является кодон-оптимизированной (*например*, кодон-оптимизированной для экспрессии в клетках млекопитающих, *например*, в клетках человека). В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая PGRN, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (*например*, эталонную последовательность NCBI NP\_002078.1). В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая PGRN, содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 4.

**[0113]** Кроме того, в данном документе предложен рекомбинантный бакуловирус, содержащий геном, содержащий представляющий интерес экзогенный ген, при этом представляющий интерес экзогенный ген кодирует белок глюкоцереброзидазы человека; и при этом белок глюкоцереброзидазы человека кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 2. Также в данном документе предложен рекомбинантный бакуловирус, содержащий геном, содержащий представляющий интерес экзогенный ген, при этом представляющий интерес экзогенный ген кодирует белок програнулин человека; и при этом белок програнулин человека кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 4. Кроме того, в данном документе предложена клетка насекомого, инфицированная рекомбинантным бакуловирусом, описанным в данном документе.

**[0114]** Каждая из одной или нескольких дополнительных популяций векторов гBV может содержать кассету экспрессии, кодирующую белок Rep AAV и/или белок Cap AAV. Кассета экспрессии Rep AAV экспрессирует репликазу AAV. Кассета экспрессии Cap AAV экспрессирует вирусные структурные белки AAV (VP1, VP2, VP3), также называемые капсидными белками. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии Cap AAV экспрессирует структурные белки AAV9. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии Cap AAV экспрессирует структурные белки AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV10 или AAV11, или варианты любого из этих структурных белков.

**Способы получения композиций, содержащих рекомбинантный аденоассоциированный вирус**

[0115] В некоторых аспектах описанный в данном документе способ получения композиции, содержащей гAAV, включает предшествующие процессы и последующие процессы. В некоторых вариантах осуществления предшествующие процессы включают размножение клеток насекомых, создание инокулята гBV, совместное заражение клеток насекомых двумя гBV, лизис инфицированных клеток, осветление лизата и концентрирование тангенциальной поточной фильтрацией (TFF1), и диафильтрацию. В некоторых вариантах осуществления последующие процессы включают аффинную очистку AAV, хроматографию, тангенциальную поточную фильтрацию (TFF2) и стерилизующую фильтрацию.

[0116] В данном документе предложен способ получения клеточного лизата, включающий: (i) получение биореактора, содержащего клетки насекомых, суспендированные в смеси, содержащей две или более среды для культивирования клеток насекомых, не содержащей сыворотки и/или белков; (ii) заражение клеток насекомых первой популяцией бакуловирусных векторов с множественностью заражения (MOI) около 1,0-2,0, где первая популяция бакуловирусных векторов содержит кассету экспрессии, кодирующую представляющий интерес генный продукт; (iii) заражение клеток насекомых одной или более дополнительными популяциями бакуловирусных векторов с множественностью заражения около 1,0-2,0, где каждая дополнительная популяция содержит кассету экспрессии, кодирующую белок Rep AAV и/или белок Cap AAV; (iv) культивирование инфицированных клеток насекомых в условиях, при которых инфицированные клетки насекомых продуцируют частицы гAAV, кодирующие представляющий интерес ген; и (v) лизис инфицированных клеток насекомых с получением клеточного лизата, содержащего частицы гAAV.

[0117] В некоторых вариантах осуществления две или более среды для культивирования насекомых, не содержащих сыворотки и/или белков, выбирают из среды 4Cell Insect CD, ESF-921, ESF-AF, среды ExpiSf CD, Express Five SFM, baculoGROW, IS SF и SF900 II SFM. В некоторых вариантах осуществления смесь содержит от около 10% об./об. до 50% об./об. среды SF900 II SFM.

[0118] В некоторых вариантах осуществления клетки насекомых получают после 4-6 пассажей производственного штамма. В некоторых вариантах осуществления заражение на стадии (ii) и заражение на стадии (iii) происходят одновременно.

[0119] В некоторых вариантах осуществления клетки насекомых присутствуют в

биореакторе при плотности клеток от  $8E+06$  жизнеспособных клеток на мл (жк/мл) до около  $20E+06$  жк/мл.

**[0120]** В некоторых вариантах осуществления культивирование на стадии (iv) происходит в течение от 1 до 5 дней.

**[0121]** В некоторых вариантах осуществления лизис на стадии (v) включает приведение инфицированных клеток насекомых в контакт с детергентом.

**[0122]** В некоторых вариантах осуществления способ получения клеточного лизата дополнительно включает стадию осветления клеточного лизата глубинной фильтрацией.

**[0123]** В некоторых вариантах осуществления способ получения клеточного лизата дополнительно включает стадию концентрирования частиц гAAV в лизате тангенциальной проточной фильтрацией и/или диафильтрацией.

**[0124]** В некоторых вариантах осуществления клеточный лизат содержит (a) от около  $1E+11$  вирусных геномов на миллилитр (вг/мл) до около  $1,0E+13$  вг/мл; (b) от около  $2E+11$  вг/мл до около  $1,0E+13$  вг/мл; или (c) от около  $5E+11$  вг/мл до около  $1,0E+13$  вг/мл.

**[0125]** Кроме того, в данном документе предложен способ получения терапевтической композиции, включающий: (i) получение клеточного лизата, содержащего частицы гAAV; (ii) приведение в контакт колонки для аффинной хроматографии с клеточным лизатом, при этом аффинная колонка содержит связывающий агент, специфичный для капсидного белка частиц гAAV, в условиях, при которых частицы гAAV связываются с колонкой для аффинной хроматографии; (iii) элюирование связанных частиц гAAV из колонки с получением таким образом первого элюата; (iv) проведение анионообменной хроматографии первого элюата для получения второго элюата, при этом второй элюат содержит меньше пустых частиц гAAV, чем первый элюат; (v) концентрирование второго элюата путем проведения тангенциальной проточной фильтрации с использованием проточного буфера, содержащего трис,  $MgCl_2$ , NaCl и полксамер 188, с получением таким образом терапевтической композиции, содержащей частицы гAAV.

**[0126]** В некоторых вариантах осуществления связывающий агент содержит аффинную смолу, специфичную в отношении капсидного белка AAV9.

**[0127]** В некоторых вариантах осуществления анионообменная хроматография включает смешивание первого элюата с буфером для уравнивания с получением смеси, имеющей проводимость от около  $0,5$  мСм/см до  $5$  мСм/см, необязательно при этом смесь имеет проводимость  $2$  мСм/см, связывание смеси со смолой, содержащей четвертичный амин, для связывания частиц гAAV в смеси со смолой и элюирование частиц гAAV со смолы для получения второго элюата.

**[0128]** В некоторых вариантах осуществления второй элюат концентрируют до от около

1,0E+12 вг/мл до около 1E+14 вг/мл. В некоторых вариантах осуществления второй элюат концентрируют до от около 1,0E+13 вг/мл до около 5E+13 вг/мл.

**[0129]** В некоторых вариантах осуществления композиции, содержащие рекомбинантный аденоассоциированный вирус, получают способом, описанным в Примере 2 (см. ниже).

**[0130]** В некоторых вариантах осуществления композиция (*например*, нерасфасованное лекарственное вещество), полученная способом, описанным в данном документе, содержит по меньшей мере около 80 %, по меньшей мере около 85 %, по меньшей мере около 90 % или по меньшей мере около 95 % полных частиц гAAV. В некоторых аспектах композиция, полученная описанным в данном документе способом, содержит менее около 15%, менее около 10% или менее около 5% пустых частиц гAAV. Способы анализа пустых частиц AAV и полных частиц AAV известны в данной области техники. *См., например, Grimm et al. (1999) Gene Therapy 6:1322-1330; Sommer et al. (2003) Mol. Ther. 7:122-128.*

**[0131]** В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, касета экспрессии Cap AAV экспрессирует структурные белки AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 или AAV11 или варианты таких структурных белков. AAV9 описан в патенте США № 7198951 и в Gao *et al.* (2004) *J. Virol.* 78:6381-6388, содержание каждого из которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

**[0132]** В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, представляющий интерес экзогенный ген представляет собой *GBA1* человека или *PGRN* человека. В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, представляющий интерес экзогенный ген кодирует белок глюкоцереброзидазы человека или белок програнулин человека. В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, белок глюкоцереброзидазы человека кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, белок програнулин человека кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, представляющий интерес экзогенный ген кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

**[0133]** В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, представляющий интерес экзогенный ген представляет собой PSAP человека, C9orf72 человека, TREM2 человека, ApoE2 человека или паркин человека. В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, представляющий интерес экзогенный ген представляет собой полинуклеотид, кодирующий ингибирующую РНК. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая РНК нацелена на  $\alpha$ -синуклеин

человека, АТХN2 человека, МАРТ человека или АроЕ человека. Примеры подходящих полинуклеотидных последовательностей для использования 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.

**[0134]** Кроме того, в данном документе предложена композиция, полученная любым из описанных в данном документе способов.

### **Испытания процесса и выпуска для композиций, содержащих рекомбинантный аденоассоциированный вирус**

**[0135]** Композиции гAAV, полученные способами, описанными в данном документе, а также материал, полученный на промежуточных стадиях способов, могут быть протестированы на один или несколько из следующих параметров: безопасность, идентификация, титр, чистота, примеси, физико-химические свойства, биологические свойства и экстрагируемый объем (объем в контейнере).

**[0136]** Анализы, оценивающие безопасность, могут включать анализы на: стерильность (Фармакопея США (USP) <71>), бактериостаз/фунгистаз (USP <71>), эндотоксин, микоплазму (USP <63>), случайный вирус *in vitro*, исследование *in vivo* на вирусное загрязнение, гсAAV и укупорку контейнера.

**[0137]** Анализы идентификации могут включать: ИФА для конкретных капсидных белков серотипа AAV, вестерн-блоттинг для анализа гAAV и выделение ДНК для последовательности представляющего интерес экзогенного гена (трансгена).

**[0138]** Анализы, оценивающие титр, могут включать: физический титр (кПЦР), инфекционный титр, TCID<sub>50</sub> и соотношение физического титра к инфекционному титру.

**[0139]** Анализы, которые оценивают чистоту и примеси, могут включать: ДСН-ПААГ/анализ с окрашиванием серебром для анализа гAAV, Тритон X-100, бензоназа с помощью ИФА, загрязнение бакуловирусом с помощью кПЦР, ТЕМ (соотношение полные/пустые), ДНК клетки-хозяина Sf9, белок клетки-хозяина Sf9 (ИФА) и обнаружение рабдовируса.

**[0140]** Анализы, которые оценивают физико-химические свойства и биологические свойства, могут включать: биологическую активность экспрессии трансгена (активность), осмоляльность для образцов цГМФ, рН для образцов контроля качества, внешний вид, субвидимые твердые частицы (USP<787>), динамическое рассеяние света и общий белок (micro-BCA).

**[0141]** В данном документе предложен анализ, который измеряет титр гAAV (*например*,

AAV9), кодирующего GСазу, с использованием кПЦР (см. Пример 11). Загрязняющий материал (*например*, неинкапсулированную ДНК) удаляют во время анализа. На начальной стадии используют ДНКазу для удаления неинкапсулированной ДНК. Затем добавляют протеиназу для высвобождения капсида AAV перед проведением кПЦР. В анализе используют специфичные для AAV9-GBA1 праймеры и зонды (прямой праймер, GAC TGT GGG ATC CGT TCG AA (SEQ ID NO: 6); обратный праймер, GAT TGA CAC CCG GCT CAG A (SEQ ID NO: 7); зонд TaqMan, 6FAM-CCA TGG AAT TCA GCA GCC CCA GC (SEQ ID NO: 8)-TAMRA) для амплификации представляющей интерес области в векторе, который затем количественно определяют с помощью кПЦР.

**[0142]** В данном документе также предложен анализ, который измеряет активность *in vitro* в отношении гAAV (*например*, AAV9), кодирующего GСазу (см. Пример 12). Анализ проводят в 96-луночном формате. Клетки HEK293 высевали в количестве 20 000 клеток на лунку и трансдуцировали на следующий день с помощью AAV9-GBA1 в различных концентрациях как для исследуемого препарата, так и для эталонного стандарта. В некоторых вариантах осуществления эталонный стандарт представляет собой очищенный гAAV, кодирующий GСазу, активность которого была определена ранее. Клетки лизируют через 72 часа после трансдукции. Активность GСазы оценивают в этих лизатах с использованием флуорогенного субстрата резорифин-β-D-глюкопиранозид. В присутствии GСазы этот субстрат катализируется с образованием флуоресцентного продукта резорифина. Получение резорифина контролируют непосредственно по мере протекания реакции для расчета скорости образования продукта. В присутствии избытка субстрата резорифин-β-D-глюкопиранозид (5,3 мМ) и в условиях анализа скорость образования продукта линейно пропорциональна количеству белка GСазы. Для каждого анализа активности GСазы параллельно с исследуемыми образцами проводят стандартную кривую очищенной рекомбинантной GСазы (гGBA, от 0 до 333 нг/мл, кат. номер R&D № 7410-GNB-020, чистота >95%). Критерии приемлемости анализа  $R^2 \geq 0,96$  для линейной регрессии этой кривой установлены для обеспечения того, чтобы измеренная скорость ферментации коррелировала с уровнем белка GСазы. Сообщаемое значение относительной активности по отношению к эталонному стандарту рассчитывают с использованием анализа параллельных линий.

**[0143]** В данном документе также предложен анализ, измеряющий титр гAAV (*например*, AAV9), кодирующего PGRN, с использованием кПЦР или кцПЦР (см. Пример 13). Загрязняющий материал (*например*, неинкапсулированную ДНК) удаляют во время анализа. На начальной стадии используют ДНКазу для удаления неинкапсулированной ДНК. Затем добавляют протеиназу для высвобождения капсида AAV перед проведением

кПЦР или кцПЦР. В анализе используют специфичные для AAV9-GRN праймеры и зонды (прямой праймер, 5'-GTCTTCCACGACTGTGGGAT-3' (SEQ ID NO: 9); обратный праймер, 5'-GTCAGGGCCACCCAGCTC-3' (SEQ ID NO: 10); зонд TaqMan, 5'-FAM-CCGGTTGAGCCACCATGTGGACCC (SEQ ID NO: 11)-TAMRA-3') для амплификации представляющей интерес области в векторе, который затем количественно определяют с помощью кПЦР или кцПЦР.

[0144] Кроме того, в данном документе также предложен анализ, который измеряет активность *in vitro* в отношении гAAV (*например*, AAV9), кодирующего PGRN. Анализ проводят в 96-луночном формате. Клетки НЕК293 высевали в количестве 20 000 клеток на лунку и трансдуцировали на следующий день с помощью AAV9-GRN при различных концентрациях лекарственного средства как для исследуемого препарата, так и для эталонного стандарта. Через 72 часа после трансдукции уровни PGRN измеряют с помощью ИФА (AdipoGen Life Sciences кат. номер № AG-45A-0018YEK-KI01). Сообщаемое значение относительной активности по отношению к эталонному стандарту рассчитывают с использованием анализа параллельных линий.

[0145] 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.

[0146] 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.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1**

[0147] Клетки насекомых размораживают и высевают в первую среду для культивирования клеток насекомых, не содержащую сыворотку и/или белок (*например*, среду 4Cell Insect CD, ESF-921, ESF AF, среду ExpiSf CD, Express Five SFM, baculoGROW, IS SF и SF900 II SFM) с концентрацией жизнеспособных клеток более  $3,0E+05$ /мл (пассаж 1, P1) для создания посевной культуры. Клетки в посевной культуре культивируют в течение 4-6 пассажей, а затем высевают в основную биореакцию для получения гAAV.

[0148] Во время основной биореакции указанную выше посевную культуру перемещают в

емкость для культивирования N-2 путем смешивания 2 л посевной культуры с первой средой для клеток насекомых с плотностью от около  $4,0E+05$  до  $6,0E+05$  клеток/мл до общего объема 10 л. Клетки культивируют в емкости для культивирования N-2 в течение 96 часов до достижения плотности культуры более  $5,5E+06$  жк/мл с более чем 90% жизнеспособных клеток. Затем 10 л клеток культуры N-2 перемещают в емкость для культивирования N-1 и смешивают с первой средой для клеток насекомых при исходной плотности клеток от около  $5,0E+05$  до  $1,5E+06$  жк/мл. Культура N-1 также содержит 0,1-0,3% (об./об.) раствора полоксамера-188. Общий объем в емкости для культивирования N-1 доводят до 50 л путем добавления большего количества первой среды для культивирования насекомых. При необходимости в культуру можно добавить пеногаситель. Клетки культивируют в течение 72 часов до достижения конечной плотности более  $5,5E+06$  жк/мл с более чем 90% жизнеспособных клеток.

**[0149]** При подготовке к инфицированию гBV культуру N-1 смешивают со второй средой для культивирования клеток насекомых, не содержащей сыворотки и/или белка (*например*, средой 4Cell Insect CD, ESF-921, ESF AF, средой ExpiSf CD, Express Five SFM, baculoGROW, IS SF и SF900 II SFM) с добавлением пеногасителя и 0,1-0,3% (об./об.) раствора полоксамера-188. К смеси добавляют первую среду для клеток насекомых до достижения общего желаемого объема. Соотношение первой среды для клеток насекомых в смеси на этой стадии составляет от около 30% до 70%. Исходная плотность клеток составляет от около  $1,00E+06$  до  $2,00E+06$  жк/мл. Клетки культивируют в течение 96 часов до достижения плотности клеток от  $1,00E+07$  до  $2,00E+07$  жк/мл. Затем клетки инфицируют гBV, кодирующим Cap Rep/AAV9, и гBV, кодирующим целевой ген (*например*, GBA, PGRN, PSAP, TREM2 или APOE), с множественностью заражения от около 1 инфекционной единицы (ИЕ)/клетка до 2 ИЕ/клетка для каждого гBV. Объем каждого гBV, добавленного к культуре, составляет от около 5 до 26 л в зависимости от титра вируса. После добавления гBV к культуре общий объем культуры регулируют с использованием второй среды для клеток насекомых таким образом, чтобы процентное содержание первой среды для клеток насекомых в смеси составляло от 10% до 50% (об./об.). Между 15 и 25 часами после инфицирования в культуру добавляют добавку для повышения продуктивности (РВА; англ.: Production Boost Additive) в количестве от около 3% до 8% (об./об.). Клетки собирают через около 72-120 часов после инфицирования.

**[0150]** Для сбора клетки насекомых лизируют в Трис-буфере с около 0,2% и 0,8% (мас./об.) Тритона. Клетки инкубируют в буфере для лизиса в течение от около 30 минут до около 90 минут. Лизат клеток обрабатывают бензоназой в концентрации от около 42-60 ИЕ/мл в присутствии около 1,5-2,5 мМ  $MgCl_2$  в течение около 45-75 минут. Реакцию гасят с

помощью около 100-300 мМ NaCl. Лизат клеток содержит гAAV, упакованный инфицированными клетками насекомых.

**[0151]** Полученный клеточный лизат затем подвергают стадиям осветления. Первичное осветление осуществляют путем глубинной фильтрации с использованием глубинного фильтра Millistak+® HC Pod, серии сред D0HC, площадь поверхности 1,1 м<sup>2</sup> (POD D0HC) при скорости потока промывания около 12–20 л/мин и максимальном давлении 8–14 фунтов на кв. дюйм. Затем клеточный лизат очищают глубинной фильтрацией с использованием глубинного фильтра Millistak+® HC Pod, серии сред A1HC, площадь поверхности 0,11 м<sup>2</sup> (POD A1HC) при скорости потока промывания около 8-15 л/мин и давлении 8-14 фунтов на кв. дюйм. Затем лизат кондиционируют и прогоняют с использованием первой среды для культивирования насекомых, которая дает около 75-95% клеточного лизата перед стадией осветления. Клеточный лизат концентрируют с помощью TFF. Во время TFF клеточный лизат подвергают промыванию водой, кондиционированию диафильтрационным буфером (буфером DF), промыванию буфером DF и прогону буфера DF. Буфер DF содержит 20 мМ Трис, 500 мМ NaCl и 0,1% плуроника и имеет pH около 7,5-8,5. Стадию промывания буфером DF выполняют при коэффициенте концентрации 3-8. Выход после концентрирования составляет от около 60% до около 80% лизата перед TFF.

**[0152]** Концентрированный клеточный лизат стерильно фильтруют диафильтрацией с использованием фильтров Opticap XL10. Выход клеточного лизата после фильтрации составляет от 80% до 98% от клеточного лизата перед стерильной фильтрацией. Лизат клеток можно заморозить и хранить при температуре -80°C. В некоторых вариантах осуществления клеточный лизат размораживают и тестируют на бионагрузку.

**[0153]** Перед хроматографической очисткой гAAV клеточный лизат размораживают и фильтруют с использованием мембраны Sartopore 2. Фильтр предварительно промывают и уравнивают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Фильтрацию проводят при максимальном давлении 14,00 фунтов на кв. дюйм со скоростью потока 750 мл/мин. После фильтрации фильтр снова промывают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Для очистки гAAV за аффинной очисткой следует анионообменная очистка.

**[0154]** Для аффинной очистки гAAV используют специфическую для капсида колонку для аффинной очистки. Специфическую для капсида смола для аффинной очистки имеет загрузочную способность от около 2,00E+13 до 9,00E+13 вг/мл. Общая связывающая способность специфической для капсида смолы для аффинной очистки составляет от около 1,00E+13 до около 1,00E+14 вг/мл. В колонку вводят воду для инъекций (ВДИ) и обрабатывают 0,06-0,12 М фосфорной кислоты. Затем колонку регенерируют, используя

80-120 мМ Трис и 1,8-2,2 М NaCl. После регенерации колонку уравнивают, используя уравнивающий буфер для аффинной очистки, который содержит около 0,8-1,5 мМ лимонной кислоты, 12-22 мМ фосфата, 300-400 мМ NaCl, 0,2-0,8 % сахарозы, 0,06-0,2 % F-68. Лизат клеток загружают в колонку после уравнивания, и колонку снова уравнивают после загрузки. Промывание с высоким содержанием соли выполняют с использованием промывочного буфера, который содержит около 0,8-1,5 мМ лимонной кислоты, 12-22 мМ фосфата, 800-1500 мМ NaCl, 0,2-0,8 % сахарозы, 0,06-0,2 % F-68. После промывания с высоким содержанием соли колонку перед элюированием уравнивают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Элюирующий буфер для аффинной хроматографии содержит 10-18 мМ лимонной кислоты, 300-400 мМ NaCl, 0,2-0,8% сахарозы, 0,06-0,2% F-68 при pH от 2,2 до 2,8. Сбор элюированного гAAV начинается на пике элюирования около более 30 мАЕ при А280. После элюирования колонку обрабатывают кислотой и регенерируют. 4-9 М гидрохлорида гуанидина используют для очистки колонки при линейной скорости потока от около 45 до 70 см/ч. Затем колонку промывают водой для инъекций и буфером для хранения, который содержит 1 мМ лимонной кислоты, 18 мМ фосфата, 20% этанола при линейной скорости потока 45-70 см/ч. Буферы и образец, описанные выше, загружают в колонку с линейной скоростью потока около от 120-180 см/ч, если не указано иное. Затем элюированную фракцию нейтрализуют с использованием фосфатного буфера, который содержит 0,25-0,6 М фосфата при pH от 8,2 до 9,5. Целевой pH элюированной фракции после нейтрализации составляет 6,8-8.

**[0155]** При подготовке к анионообменной хроматографии образец из нейтральной элюированной фракции после аффинной хроматографии фильтруют с использованием фильтра Kleenpak, разводят и уравнивают с использованием уравнивающего буфера для анионообменной хроматографии, который содержит 12-22 мМ бис-триспропана, от 0,001 % до 0,01 % F-68 при pH 9,0-9,5 и проводимости от 0,5 до 3 мСм/см. Плотность загрузки колонки составляла от около 1,0+E13 до 4,0+E13 мг/мл. Перед разведением элюированной фракции колонку для анионообменной хроматографии подготавливают, выполняя следующие стадии: (i) промывают водой для инъекций, (ii) дезинфицируют буфером, содержащим 0,8-1,5 М NaOH и 1,5-2,2 М NaCl, (iii) снова промывают водой для инъекций, (iv) промывают элюирующим буфером для анионообменной хроматографии, который содержит 16-24 мМ бис-триспропана, 0,8-1,5 М NaCl, от 0,001 % до 0,01 % F-68, и (v) уравнивают буфером для уравнивания анионообменной хроматографии, который содержит 12-22 мМ бис-триспропана, от 0,001% до 0,01% F-68. Как только анионообменная хроматографическая колонка уравновешена, образец загружают в колонку с загрузочным pH от около 9,0 до 9,5 и загрузочной

проводимостью от 0,5 до 3 мСм/см. После загрузки колонку снова промывают уравнивающим буфером для анионообменной хроматографии. Образец элюируют сначала уравнивающим буфером для анионообменной хроматографии, а затем элюирующим буфером для анионообменной хроматографии. Сбор фракции, содержащей гAAV, начинается на пике элюирования около более 3 мАЕ при А280 и заканчивается на пике элюирования около менее 20 мАЕ. Затем, элюированную фракцию после анионообменной хроматографии нейтрализуют, используя буфер для нейтрализации CIM QA, который содержит 0,2-1 М Трис/HCL при pH около от 5,8 до 6,8. Буферы и образцы во время анионообменной хроматографии загружают в колонку при объемной скорости потока от 1,2 л/мин до 2,5 л/мин, если не указано иное.

**[0156]** После нейтрализации образец концентрируют путем тангенциальной проточной фильтрации и ультрафильтрации/диафильтрации с плотностью загрузки от около  $1,0E+17$  до  $2,0E+17$   $vg/m^2$  вирусных частиц. Буфер, используемый при фильтрации, содержит Трис,  $MgCl_2$ , NaCl и полксамер 188.

**[0157]** Отфильтрованный образец содержит очищенные частицы гAAV и хранится в хранилище BDS при температуре  $-80\text{ }^{\circ}C$ . Исходный BDS содержит частицы гAAV от около  $2,5E+13$  до  $4,5E+13$   $vg/ml$  и может быть разведен до концентрации DP более  $1E+13$   $vg/ml$ . Образцы проходят стерилизующую фильтрацию перед упаковкой.

## **Пример 2**

**[0158]** Клетки насекомых размораживали и высевали в SF900 II SFM при концентрации более  $3,0E+05$  жизнеспособных клеток/мл (пассаж 1, P1) для создания посевной культуры. Клетки в посевной культуре культивировали в течение 5 пассажей, а затем высевали в основную биореакцию для получения гAAV.

**[0159]** Во время основной биореакции указанную выше посевную культуру перемещали в емкость для культивирования N-2 путем смешивания 2 л посевной культуры с SF900 II SFM с плотностью около  $5,0E+05$  клеток/мл до общего объема 10 л. Клетки культивировали в емкости для культивирования N-2 в течение 96 часов до достижения плотности культуры более  $5,5E+06$  жк/мл с более чем 90% жизнеспособных клеток. Затем 10 л клеток культуры N-2 перемещали в емкость для культивирования N-1 и смешивали с SF-900 II SFM при исходной плотности клеток около  $1,0E+06$  жк/мл. Культура N-1 также содержала 0,1% (об./об.) раствора полксамера-188. Общий объем в емкости для культивирования N-1 довели до 50 л путем добавления большего количества SF900 II SFM. При необходимости в культуру можно добавить пеногаситель. Клетки культивировали в течение 72 часов до достижения конечной плотности более  $5,5E+06$  жк/мл с более чем 90%

жизнеспособных клеток.

**[0160]** При подготовке к инфицированию гBV культуру N-1 смешивали со средой ESF AF и добавляли пеногаситель и 0,1% (об./об.) раствор полоксамера-188. К смеси добавляли среду SF900 II SFM до достижения общего желаемого объема. Соотношение SF900 II SFM в смеси на этой стадии составляло около 60% (об./об.). Исходная плотность клеток составляла около  $1,50E+06$ . Клетки культивировали в течение 96 часов до достижения плотности клеток  $1,50E+07$  жк/мл. Затем клетки инфицировали гBV, кодирующим Cap Rep/AAV9, и гBV, кодирующим целевой ген (*например*, GBA, PGRN, PSAP, TREM2 или APOE), с множественностью заражения около 1,5 инфекционных единиц (ИЕ)/клетка для каждого гBV. Объем каждого гBV, добавленного к культуре, составлял от около 5 до 26 л в зависимости от титра вируса. После добавления гBV к культуре общий объем культуры регулировали с использованием среды ESF AF таким образом, чтобы процентное содержание SF900 II SFM в смеси составляло 40% (об./об.). Примерно через 20 часов после инфицирования в культуру добавляли добавку для повышения продуктивности (РВА) в количестве около 5% (об./об.). Клетки собирали через около 72 часа после инфицирования.

**[0161]** При сборе клетки насекомых лизировали в Трис-буфере с 0,5% (мас./об.) Тритона. Клетки инкубировали в буфере для лизиса в течение около 60 минут. Лизат клеток обрабатывали бензоназой в концентрации около 50 ИЕ/мл в присутствии около 2 мМ  $MgCl_2$  в течение около 60 мин. Реакцию гасили с помощью около 240 мМ NaCl. Лизат клеток содержал гAAV, упакованный инфицированными клетками насекомых.

**[0162]** Полученный клеточный лизат затем подвергали стадиям осветления. Первичное осветление осуществляли путем глубинной фильтрации с использованием глубинного фильтра Millistak+<sup>®</sup> HC Pod, серии сред DONC, площадь поверхности 6 x 1,1 м<sup>2</sup> (POD DONC) при скорости потока промывания около 18 л/мин и максимальном давлении менее 14 фунтов на кв. дюйм. Затем клеточный лизат очищали глубинной фильтрацией с использованием глубинного фильтра Millistak+<sup>®</sup> HC Pod, серии сред A1HC, площадь поверхности 3 x 1,1 м<sup>2</sup> (POD A1HC) при скорости потока промывания около 11/мин и давлении менее 14 фунтов на кв. дюйм. Затем лизат кондиционировали и прогоняли с использованием SF900 II SFM, что дает около 80% клеточного лизата перед стадией осветления. Клеточный лизат концентрировали с помощью TFF. Во время TFF клеточный лизат подвергают промыванию водой, кондиционированию диафильтрационным буфером (буфером DF), промыванию буфером DF и прогону буфера DF. Буфер DF содержит 20 мМ Трис, 500 мМ NaCl и 0,001% плуроника и имеет pH около 8,0. Стадия промывания буфером DF выполняли при коэффициенте концентрации 6. Выход после концентрирования составлял около 90% лизата перед TFF.

**[0163]** Концентрированный клеточный лизат стерильно фильтровали диафильтрацией с использованием фильтров Opticap XL10. Выход клеточного лизата после фильтрации составлял около 95% от клеточного лизата перед стерильной фильтрацией. Лизат клеток можно заморозить и хранить при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**[0164]** Перед хроматографической очисткой гAAV клеточный лизат размораживали и фильтровали с использованием мембраны Sartopore 2. Фильтр предварительно промывали и уравнивали уравнивающим буфером для аффинной очистки. Фильтрацию проводили при максимальном давлении 14,00 фунтов на кв. дюйм со скоростью потока 750 мл/мин. После фильтрации фильтр снова промывали уравнивающим буфером для аффинной очистки. Для очистки гAAV за аффинной очисткой следовала анионообменная очистка.

**[0165]** Для аффинной очистки гAAV использовали специфическую для капсида колонку WAS аффинной очистки. Специфическую для капсида смола для аффинной очистки имела загрузочную способность от около 3,0 до  $9,0\text{E}+13$  вг/мл. Общая связывающая способность специфической для капсида смолы для аффинной очистки составляла около  $4,2\text{E}+17$  вг. В колонку вводили воду для инъекций (ВДИ) и обрабатывали 0,1 М фосфорной кислоты. Затем колонку регенерировали, используя 100 мМ Трис и 2 М NaCl. После регенерации колонку уравнивали, используя уравнивающий буфер для аффинной очистки, который содержит около 1 мМ лимонной кислоты, 18 мМ фосфата, 350 мМ NaCl, 0,5 % сахарозы, 0,1 % F-68. Лизат клеток загружали в колонку после уравнивания, и после загрузки колонку снова уравнивали уравнивающим буфером для аффинной очистки. Промывание с высоким содержанием соли проводили с использованием промывочного буфера, который содержит около 1 мМ лимонной кислоты, 18 мМ фосфата, 1000 мМ NaCl, 0,5% сахарозы, 0,1% F-68. После промывания с высоким содержанием соли колонку перед элюированием уравнивали уравнивающим буфером для аффинной очистки. Элюирующий буфер для аффинной хроматографии содержит 14 мМ лимонной кислоты, 350 мМ NaCl, 0,5% сахарозы, 0,1 % F-68 при pH 2,5. Сбор элюированного гAAV начинали на пике элюирования около более 50 мАЕ при A280. После элюирования колонку обрабатывали кислотой и регенерировали. Для очистки колонки использовали 6 М гидрохлорида гуанидина при линейной скорости потока около 60 см/ч. Затем колонку промывали водой для инъекций и буфером для хранения, который содержит 1 мМ лимонной кислоты, 18 мМ фосфата, 20% этанола при линейной скорости потока 60 см/ч. Буферы и образец, описанные выше, загружали в колонку с линейной скоростью потока около 150 см/ч, если не указано иное. Затем элюированную фракцию нейтрализовали с помощью фосфатного буфера, содержащего 0,4 М фосфата при pH 9.

Целевой рН элюированной фракции после нейтрализации составлял 6,8-8.

**[0166]** При подготовке к анионообменной хроматографии образец из нейтрализованной элюированной фракции после аффинной хроматографии фильтровали с использованием фильтра Kleenprak, разводят и уравнивают с использованием уравнивающего буфера для анионообменной хроматографии, который содержит 20 мМ бис-трис-пропана, 0,001 % F-68 при рН 9,2 и проводимости менее 2,1 мСм/см. Плотность загрузки колонки составляла от около  $1,0 \times 10^{13}$  до  $4,0 \times 10^{13}$  вг/мл. Перед разведением элюированной фракции колонку для анионообменной хроматографии подготавливают, выполняя следующие стадии: (i) промывают водой для инъекций, (ii) дезинфицируют буфером, содержащим 1 М NaOH и 2 М NaCl, (iii) снова промывают водой для инъекций, (iv) промывают элюирующим буфером для анионообменной хроматографии, который содержит 20 мМ бис-триспропана, 1 М NaCl, 0,001 % F-68, и (v) уравнивают буфером для уравнивания анионообменной хроматографии, который содержит 20 мМ бис-трис-пропана, 0,001 % F-68. Как только анионообменная хроматографическая колонка была уравновешена, образец загружали в колонку с буфером CIMQ, имеющим рН около 9,3 и загрузочной проводимостью менее 2 мСм/см. После загрузки колонку снова промывали уравнивающим буфером для анионообменной хроматографии. Образец элюировали сначала уравнивающим буфером для анионообменной хроматографии, а затем элюирующим буфером для анионообменной хроматографии. Сбор фракции, содержащей гAAV, начинали на пике элюирования около 15 мАЕ. Затем, элюированную фракцию после анионообменной хроматографии нейтрализовали, используя буфер для нейтрализации CIM QA, который содержит 0,5 М Трис/HCL при рН около 6,5. Буферы и образцы во время анионообменной хроматографии загружали в колонку при объемной скорости потока 2 л/мин, если не указано иное.

**[0167]** После нейтрализации образец концентрировали с помощью TFF и ультрафильтрации/диафильтрации с плотностью загрузки около  $1,3 \times 10^{17}$  вг/м<sup>2</sup> вирусных частиц. Буфер, используемый при фильтрации, содержит Трис, MgCl<sub>2</sub>, NaCl и полоксамер 188.

**[0168]** Отфильтрованный образец содержал очищенные частицы гAAV и хранился в хранилище BDS при температуре -80 °C. Исходный BDS содержал частицы гAAV с концентрацией около  $4,0 \times 10^{13}$  вг/мл и может быть разведен до концентрации DP более  $3,0 \times 10^{13}$  вг/мл. Образцы проходили стерилизующую фильтрацию перед упаковкой.

### **Пример 3**

**[0169]** Клетки насекомых размораживают и высевают в среду 4Cell Insect CD при

концентрации более  $3,0E+05$  жизнеспособных клеток/мл (пассаж 1, P1) для создания посевной культуры. Клетки в посевной культуре культивируют в течение 3 пассажей, а затем высевают в основную биореакцию для получения гAAV.

**[0170]** Во время основной биореакции указанную выше посевную культуру перемещают в емкость для культивирования N-2 путем смешивания 2 л посевной культуры с средой 4Cell Insect CD с плотностью около  $3,0E+05$  клеток/мл до общего объема 10 л. Клетки культивируют в емкости для культивирования N-2 в течение 96 часов до достижения плотности культуры более  $5,5E+06$  жк/мл с более чем 85% жизнеспособных клеток. Затем 10 л клеток культуры N-2 перемещают в емкость для культивирования N-1 и смешивали с средой 4Cell Insect CD при исходной плотности клеток около  $1,0E+06$  жк/мл. Культура N-1 также содержала 9% (об./об.) раствора полоксамера-188. Общий объем в емкости для культивирования N-1 доводят до 50 л путем добавления большего количества среды 4Cell Insect CD. При необходимости в культуру можно добавить пеногаситель. Клетки культивируют в течение 72 часов до достижения конечной плотности более  $5,5E+06$  жк/мл с более чем 85% жизнеспособных клеток.

**[0171]** При подготовке к инфицированию гBV культуру N-1 смешивают со средой ExpiSf CD и добавляют пеногаситель и 9% (об./об.) раствор полоксамера-188. Среду 4Cell Insect CD добавляют к смеси до достижения желаемого общего объема. Соотношение среды 4Cell Insect CD в смеси на этой стадии составляет около 45% (об./об.). Исходная плотность клеток составляет около  $1,20E+06$ . Клетки культивируют в течение 96 часов до достижения плотности клеток  $1,20E+07$ . Затем клетки инфицируют гBV, кодирующим Cap Rep/AAV9, и гBV, кодирующим целевой ген (*например*, GBA, PGRN, PSAP, TREM2 или APOE), с множественностью заражения около 1 инфекционных единиц (ИЕ)/клетка для каждого гBV. Объем каждого гBV, добавленного к культуре, составляет от около 5 до 26 л в зависимости от титра вируса. После добавления к культуре гBV общий объем культуры регулируют с помощью среды ExpiSf CD таким образом, чтобы процентное содержание среды 4Cell Insect CD в смеси составляло 40% (об./об.). Примерно через 25 часов после инфицирования в культуру добавляют добавку для повышения продуктивности (РВА) в количестве около 5% (об./об.). Клетки собирают через около 96 часа после инфицирования.

**[0172]** При сборе клетки насекомых лизируют в Трис-буфере с 0,5% (мас./об.) Тритона. Клетки инкубируют в буфере для лизиса в течение около 60 минут. Лизат клеток обрабатывают бензоназой в концентрации около 30 ИЕ/мл в присутствии около 2,5 мМ  $MgCl_2$  в течение около 60 мин. Реакцию гасят с помощью около 300 мМ NaCl. Лизат клеток содержит гAAV, упакованный инфицированными клетками насекомых.

**[0173]** Полученный клеточный лизат затем подвергают стадиям осветления. Первичное

осветление осуществляют путем глубинной фильтрации с использованием глубинного фильтра Millistak+® HC Pod, серии сред D0HC, площадь поверхности 1,1 м<sup>2</sup> (POD D0HC) при скорости потока промывания около 12 л/мин и максимальном давлении менее 12 фунтов на кв. дюйм. Затем клеточный лизат очищают глубинной фильтрацией с использованием глубинного фильтра Millistak+® HC Pod, серии сред A1HC, площадь поверхности 0,11 м<sup>2</sup> (POD A1HC) при скорости потока промывания около 9/мин и давлении менее 12 фунтов на кв. дюйм. Затем лизат кондиционируют и прогоняют с использованием среды 4Cell Insect CD, что дает около 85% клеточного лизата перед стадией осветления. Клеточный лизат концентрируют с помощью TFF. Во время TFF клеточный лизат подвергают промыванию водой, кондиционированию диафильтрационным буфером (буфером DF), промыванию буфером DF и прогону буфера DF. Буфер DF содержит 20 мМ Трис, 500 мМ NaCl и 0,001% плуроника и имеет pH около 8,5. Стадию промывания буфером DF выполняют при коэффициенте концентрации 5. Выход после концентрирования составляет около 80% лизата перед TFF.

**[0174]** Концентрированный клеточный лизат стерильно фильтруют диафильтрацией с использованием фильтров Opticap XL10. Выход клеточного лизата после фильтрации составляет около 90% от клеточного лизата перед стерильной фильтрацией. Лизат клеток можно заморозить и хранить при температуре -80°C.

**[0175]** Перед хроматографической очисткой гAAV клеточный лизат размораживают и фильтруют с использованием мембраны Sartopore 2. Фильтр предварительно промывают и уравнивают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Фильтрацию проводят при максимальном давлении 12,00 фунтов на кв. дюйм со скоростью потока 780 мл/мин. После фильтрации фильтр снова промывают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Для очистки гAAV за аффинной очисткой следует анионообменная очистка.

**[0176]** Для аффинной очистки гAAV используют специфическую для капсида колонку для аффинной очистки. Специфическую для капсида смола для аффинной очистки имеет грузочную способность от около 3,0E+13 вг/мл. Общая связывающая способность специфической для капсида смолы для аффинной очистки составляла около 1,20E+17. В колонку вводят воду для инъекций (ВДИ) и обрабатывают 0,1 М фосфорной кислоты. Затем колонку регенерируют, используя 85 мМ Трис и 2 М NaCl. После регенерации колонку уравнивают, используя уравнивающий буфер для аффинной очистки, который содержит около 1,2 мМ лимонной кислоты, 15 мМ фосфата, 300 мМ NaCl, 0,2 % сахарозы, 0,08 % F-68. Лизат клеток загружают в колонку после уравнивания, и после загрузки колонку снова уравнивают уравнивающим буфером для аффинной

очистки. Промывание с высоким содержанием соли проводят с использованием промывочного буфера, который содержит около 1,2 мМ лимонной кислоты, 15 мМ фосфата, 800 мМ NaCl, 0,2% сахарозы, 0,08% F-68. После промывания с высоким содержанием соли колонку перед элюированием уравнивают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Элюирующий буфер для аффинной хроматографии содержит 10 мМ лимонной кислоты, 300 мМ NaCl, 0,2% сахарозы, 0,08 % F-68 при pH 2,2. Сбор элюированного гAAV начинается на пике элюирования около более 30 мАЕ при A280. После элюирования колонку обрабатывают кислотой и регенерируют. Для очистки колонки используют 4 М гидрохлорида гуанидина при линейной скорости потока около 60 см/ч. Затем колонку промывают водой для инъекций и буфером для хранения, который содержит 1,2 мМ лимонной кислоты, 15 мМ фосфата, 20% этанола при линейной скорости потока 60 см/ч. Буферы и образец, описанные выше, загружают в колонку с линейной скоростью потока около 120 см/ч, если не указано иное. Затем элюированную фракцию нейтрализуют с использованием фосфатного буфера, который содержит 0,25 М фосфата при pH 8,8. Целевой pH элюированной фракции после нейтрализации составляет 7,5.

**[0177]** При подготовке к анионообменной хроматографии образец из нейтральной элюированной фракции после аффинной хроматографии фильтруют с использованием фильтра Kleenpak, разводят и уравнивают с использованием уравнивающего буфера для анионообменной хроматографии, который содержит 12 мМ бис-трис-пропана, 0,001 % F-68 при pH 9,0 и проводимости менее 2,5 мСм/см. Плотность загрузки колонки составляла от около  $1,0 \times 10^{13}$  до  $4,0 \times 10^{13}$  вг/мл. Перед разведением элюированной фракции колонку для анионообменной хроматографии подготавливают, выполняя следующие стадии: (i) промывают водой для инъекций, (ii) дезинфицируют буфером, содержащим 0,8 М NaOH и 2 М NaCl, (iii) снова промывают водой для инъекций, (iv) промывают элюирующим буфером для анионообменной хроматографии, который содержит 16 мМ бис-триспропана, 0,8 М NaCl, 0,0008 % F-68, и (v) уравнивают буфером для уравнивания анионообменной хроматографии, который содержит 20 мМ бис-триспропана, 0,001 % F-68. Как только анионообменная хроматографическая колонка уравновешена, образец загружают в колонку с загрузочным pH около 9,0 и загрузочной проводимостью 2,3 мСм/см. После загрузки колонку снова промывают уравнивающим буфером для анионообменной хроматографии. Образец элюируют сначала уравнивающим буфером для анионообменной хроматографии, а затем элюирующим буфером для анионообменной хроматографии. Сбор фракции, содержащей гAAV, начинается на пике элюирования около более 6 мАЕ при A280 и заканчивается на пике элюирования около менее 20 мАЕ. Затем, элюированную фракцию после

анионообменной хроматографии нейтрализуют, используя буфер для нейтрализации CIM QA, который содержит 0,4 М Трис/HCL при pH около 6,0. Буферы и образцы во время анионообменной хроматографии загружают в колонку при объемной скорости потока 1,5 л/мин, если не указано иное.

**[0178]** После нейтрализации образец концентрируют путем тангенциальной проточной фильтрации и ультрафильтрации/диафильтрации с плотностью загрузки от около  $1,42E+17$  вг/м<sup>2</sup> вирусных частиц. Буфер, используемый при фильтрации, содержит Трис, MgCl<sub>2</sub>, NaCl и полоксамер 188.

**[0179]** Отфильтрованный образец содержит очищенные частицы гAAV и хранится в хранилище BDS при температуре -80 °C. Исходный BDS содержит частицы гAAV с концентрацией около  $3,0E+13$  вг/мл и может быть разведен до концентрации DP более  $1,0E+13$  вг/мл. Образцы проходят стерилизующую фильтрацию перед упаковкой.

#### **Пример 4**

**[0180]** Клетки насекомых размораживают и высевают в среду ESF AF при концентрации более  $3,0E+05$  жизнеспособных клеток/мл (пассаж 1, P1) для создания посевной культуры. Клетки в посевной культуре культивируют в течение 4 пассажей, а затем высевают в основную биореакцию для получения гAAV.

**[0181]** Во время основной биореакции указанную выше посевную культуру перемещают в емкость для культивирования N-2 путем смешивания 2 л посевной культуры с средой ESF AF с плотностью около  $4,0E+05$  клеток/мл до общего объема 10 л. Клетки культивируют в емкости для культивирования N-2 в течение 96 часов до достижения плотности культуры более  $6,2E+06$  жк/мл с более чем 93% жизнеспособных клеток. Затем 10 л клеток культуры N-2 перемещают в емкость для культивирования N-1 и смешивали с средой ESF AF при исходной плотности клеток около  $1,0E+06$  жк/мл. Культура N-1 также содержит 10% (об./об.) раствора полоксамера-188. Общий объем в емкости для культивирования N-1 доводят до 50 л путем добавления большего количества среды ESF AF. При необходимости в культуру можно добавить пеногаситель. Клетки культивируют в течение 72 часов до достижения конечной плотности более  $6E+06$  жк/мл с более чем 90% жизнеспособных клеток.

**[0182]** При подготовке к инфицированию гBV культуру N-1 смешивают со средой ExpiSf CD и добавляют пеногаситель и 10% (об./об.) раствор полоксамера-188. К смеси добавляют среду ESF AF до достижения общего желаемого объема. Соотношение среды ESF AF в смеси на этой стадии составляет около 50% (об./об.). Исходная плотность клеток составляет около  $1,80E+06$ . Клетки культивируют в течение 96 часов до достижения

плотности клеток  $1,80E+07$ . Затем клетки инфицируют гBV, кодирующим Cap Rep/AAV9, и гBV, кодирующим целевой ген (*например*, GBA, PGRN, PSAP, TREM2 или APOE), с множественностью заражения около 1,8 инфекционных единиц (ИЕ)/клетка для каждого гBV. Объем каждого гBV, добавленного к культуре, составляет от около 5 до 26 л в зависимости от титра вируса. После добавления к культуре гBV общий объем культуры регулируют с помощью среды ExpiSf CD таким образом, чтобы процентное содержание среды ESF AF в смеси составляло 40% (об./об.). Примерно через 25 часов после инфицирования в культуру добавляют добавку для повышения продуктивности (РВА) в количестве около 7% (об./об.). Клетки собирают через около 84 часа после инфицирования. **[0183]** При сборе клетки насекомых лизируют в Трис-буфере с 0,5% (мас./об.) Тритона. Клетки инкубируют в буфере для лизиса в течение около 45 минут. Лизат клеток обрабатывают бензоазой в концентрации около 30 ИЕ/мл в присутствии около 2,2 мМ  $MgCl_2$  в течение около 60 мин. Реакцию гасят с помощью около 300 мМ NaCl. Лизат клеток содержит гAAV, упакованный инфицированными клетками насекомых.

**[0184]** Полученный клеточный лизат затем подвергают стадиям осветления. Первичное осветление осуществляют путем глубинной фильтрации с использованием глубинного фильтра Millistak+® HC Pod, серии сред D0HC, площадь поверхности  $1,1 \text{ м}^2$  (POD D0HC) при скорости потока промывания около 14 л/мин и максимальном давлении 10 фунтов на кв. дюйм. Затем клеточный лизат очищают глубинной фильтрацией с использованием глубинного фильтра Millistak+® HC Pod, серии сред A1HC, площадь поверхности  $0,11 \text{ м}^2$  (POD A1HC) при скорости потока промывания около 10/мин и давлении около 10 фунтов на кв. дюйм. Затем лизат кондиционируют и прогоняют с использованием среды ESF AF, что дает около 85% клеточного лизата перед стадией осветления. Клеточный лизат концентрируют с помощью TFF. Во время TFF клеточный лизат подвергают промыванию водой, кондиционированию диафильтрационным буфером (буфером DF), промыванию буфером DF и прогону буфера DF. Буфер DF содержит 20 мМ Трис, 500 мМ NaCl и 0,001% плуроника и имеет рН около 8,0. Стадию промывания буфером DF выполняют при коэффициенте концентрации 5. Выход после концентрирования составляет около 80% лизата перед TFF.

**[0185]** Концентрированный клеточный лизат стерильно фильтруют диафильтрацией с использованием фильтров Opticor XL10. Выход клеточного лизата после фильтрации составляет около 95% от клеточного лизата перед стерильной фильтрацией. Лизат клеток можно заморозить и хранить при температуре  $-80^\circ\text{C}$ .

**[0186]** Перед хроматографической очисткой гAAV клеточный лизат размораживают и фильтруют с использованием мембраны Sartopore 2. Фильтр предварительно промывают и

уравновешивают уравновешивающим буфером для аффинной очистки. Фильтрацию проводят при давлении около 10,00 фунтов на кв. дюйм со скоростью потока 780 мл/мин. После фильтрации фильтр снова промывают уравновешивающим буфером для аффинной очистки. Для очистки гAAV за аффинной очисткой следует анионообменная очистка.

**[0187]** Для аффинной очистки гAAV используют специфическую для капсида колонку для аффинной очистки. Специфическую для капсида смола для аффинной очистки имеет загрузочную способность от около  $3,2E+13$  вг/мл. Общая связывающая способность специфической для капсида смолы для аффинной очистки составляла около  $1,50E+17$ . В колонку вводят воду для инъекций (ВДИ) и обрабатывают 0,08 М фосфорной кислоты. Затем колонку регенерируют, используя 85 мМ Трис и 1,8 М NaCl. После регенерации колонку уравновешивают, используя уравновешивающий буфер для аффинной очистки, который содержит около 1,2 мМ лимонной кислоты, 18 мМ фосфата, 380 мМ NaCl, 0,5 % сахарозы, 0,08 % F-68. Лизат клеток загружают в колонку после уравновешивания, и после загрузки колонку снова уравновешивают уравновешивающим буфером для аффинной очистки. Промывание с высоким содержанием соли проводят с использованием промывочного буфера, который содержит около 1,2 мМ лимонной кислоты, 18 мМ фосфата, 800 мМ NaCl, 0,5% сахарозы, 0,08% F-68. После промывания с высоким содержанием соли колонку перед элюированием уравновешивают уравновешивающим буфером для аффинной очистки. Элюирующий буфер для аффинной хроматографии содержит 15 мМ лимонной кислоты, 380 мМ NaCl, 0,5% сахарозы, 0,08 % F-68 при pH 2,5. Сбор элюированного гAAV начинается на пике элюирования около более 60 мАЕ при A280. После элюирования колонку обрабатывают кислотой и регенерируют. Для очистки колонки используют 6 М гидрохлорида гуанидина при линейной скорости потока около 45 см/ч. Затем колонку промывают водой для инъекций и буфером для хранения, который содержит 1,2 мМ лимонной кислоты, 18 мМ фосфата, 20% этанола при линейной скорости потока 60 см/ч. Буферы и образец, описанные выше, загружают в колонку с линейной скоростью потока около 150 см/ч, если не указано иное. Затем элюированную фракцию нейтрализуют с использованием фосфатного буфера, который содержит 0,4 М фосфата при pH 8,8. Целевой pH элюированной фракции после нейтрализации составляет 7,2.

**[0188]** При подготовке к анионообменной хроматографии образец из нейтрализованной элюированной фракции после аффинной хроматографии фильтруют с использованием фильтра Kleenpak, разводят и уравновешивают с использованием уравновешивающего буфера для анионообменной хроматографии, который содержит 18 мМ бис-трис-пропана, 0,001 % F-68 при pH 9,0 и проводимости менее 1,8 мСм/см. Плотность загрузки колонки составляла от около  $1,0+E13$  до  $4,0+E13$  вг/мл. Перед разведением элюированной фракции

колонку для анионообменной хроматографии подготавливают, выполняя следующие стадии: (i) промывают водой для инъекций, (ii) дезинфицируют буфером, содержащим 0,8 М NaOH и 2 М NaCl, (iii) снова промывают водой для инъекций, (iv) промывают элюирующим буфером для анионообменной хроматографии, который содержит 18 мМ бис-триспропана, 1 М NaCl, 0,001 % F-68, и (v) уравнивают буфером для уравнивания анионообменной хроматографии, который содержит 18 мМ бис-трис-пропана, 0,001 % F-68. Как только анионообменная хроматографическая колонка уравновешена, образец загружают в колонку с загрузочным рН около 9,0 и загрузочной проводимостью 2,1 мСм/см. После загрузки колонку снова промывают уравнивающим буфером для анионообменной хроматографии. Образец элюируют сначала уравнивающим буфером для анионообменной хроматографии, а затем элюирующим буфером для анионообменной хроматографии. Сбор фракции, содержащей гAAV, начинается на пике элюирования около более 4 мАЕ при А280 и заканчивается на пике элюирования около менее 15 мАЕ. Затем, элюированную фракцию после анионообменной хроматографии нейтрализуют, используя буфер для нейтрализации CIM QA, который содержит 0,6 М Трис/HCL при рН около 6,0. Буферы и образцы во время анионообменной хроматографии загружают в колонку при объемной скорости потока 2 л/мин, если не указано иное.

**[0189]** После нейтрализации образец концентрируют путем тангенциальной проточной фильтрации и ультрафильтрации/диафильтрации с плотностью загрузки от около  $1,42E+17$  вг/м<sup>2</sup> вирусных частиц. Буфер, используемый при фильтрации, содержит Трис, MgCl<sub>2</sub>, NaCl и полоксамер 188.

**[0190]** Отфильтрованный образец содержит очищенные частицы гAAV и хранился в хранилище BDS при температуре -80 °С. Исходный BDS содержит частицы гAAV с концентрацией около  $3,0E+13$  вг/мл и может быть разведен до концентрации DP более  $1,0E+13$  вг/мл. Образцы проходят стерилизующую фильтрацию перед упаковкой.

### **Пример 5**

**[0191]** Клетки насекомых размораживают и высевают в среду Express Five SFM при концентрации более  $3,0E+05$  жизнеспособных клеток/мл (пассаж 1, P1) для создания посевной культуры. Клетки в посевной культуре культивируют в течение 5 пассажей, а затем высевают в основную биореакцию для получения гAAV.

**[0192]** Во время основной биореакции указанную выше посевную культуру перемещают в емкость для культивирования N-2 путем смешивания 2 л посевной культуры с Express Five SFM с плотностью около  $5,0E+05$  клеток/мл до общего объема 10 л. Клетки культивируют в емкости для культивирования N-2 в течение 96 часов до достижения плотности культуры

более  $6E+06$  жк/мл с более чем 90% жизнеспособных клеток. Затем 10 л клеток культуры N-2 перемещают в емкость для культивирования N-1 и смешивали с Express Five SFM при исходной плотности клеток около  $1,2E+06$  жк/мл. Культура N-1 также содержит 12% (об./об.) раствора полоксамера-188. Общий объем в емкости для культивирования N-1 доводят до 50 л путем добавления большего количества среды Express Five SFM. При необходимости в культуру можно добавить пеногаситель. Клетки культивируют в течение 72 часов до достижения конечной плотности более  $6E+06$  жк/мл с более чем 90% жизнеспособных клеток.

**[0193]** При подготовке к инфицированию гBV культуру N-1 смешивают со средой IS SF и добавляют пеногаситель и 12% (об./об.) раствор полоксамера-188. К смеси добавляют Express Five SFM до достижения общего желаемого объема. Соотношение Express Five SFM в смеси на этой стадии составляет около 50% (об./об.). Исходная плотность клеток составляет около  $1,50E+06$ . Клетки культивируют в течение 96 часов до достижения плотности клеток  $1,80E+07$ . Затем клетки инфицируют гBV, кодирующим Cap Rep/AAV9, и гBV, кодирующим целевой ген (*например*, GBA, PGRN, PSAP, TREM2 или APOE), с множественностью заражения около 1,5 инфекционных единиц (ИЕ)/клетка для каждого гBV. Объем каждого гBV, добавленного к культуре, составляет от около 5 до 26 л в зависимости от титра вируса. После добавления к культуре гBV общий объем культуры регулируют с помощью среды IS SF таким образом, чтобы процентное содержание Express Five SFM в смеси составляло 40% (об./об.). Примерно через 48 часов после инфицирования в культуру добавляют добавку для повышения продуктивности (РВА) в количестве около 5% (об./об.). Клетки собирают через около 72 часа после инфицирования.

**[0194]** При сборе клетки насекомых лизируют в Трис-буфере с 0,8% (мас./об.) Тритона. Клетки инкубируют в буфере для лизиса в течение около 60 минут. Лизат клеток обрабатывают бензоназой в концентрации около 45 ИЕ/мл в присутствии около 2,2 мМ  $MgCl_2$  в течение около 60 мин. Реакцию гасят с помощью около 300 мМ NaCl. Лизат клеток содержит гAAV, упакованный инфицированными клетками насекомых.

**[0195]** Полученный клеточный лизат затем подвергают стадиям осветления. Первичное осветление осуществляют путем глубинной фильтрации с использованием глубинного фильтра Millistak+® HC Pod, серии сред D0HC, площадь поверхности  $1,1 \text{ м}^2$  (POD D0HC) при скорости потока промывания около 13 л/мин и максимальном давлении 14 фунтов на кв. дюйм. Затем клеточный лизат очищают глубинной фильтрацией с использованием глубинного фильтра Millistak+® HC Pod, серии сред A1HC, площадь поверхности  $0,11 \text{ м}^2$  (POD A1HC) при скорости потока промывания около 11 л/мин и давлении около 14 фунтов на кв. дюйм. Затем лизат кондиционируют и прогоняют с использованием Express Five

SFM, что дает около 85% клеточного лизата перед стадией осветления. Клеточный лизат концентрируют с помощью TFF. Во время TFF клеточный лизат подвергают промыванию водой, кондиционированию диафильтрационным буфером (буфером DF), промыванию буфером DF и прогону буфера DF. Буфер DF содержит 20 мМ Трис, 500 мМ NaCl и 0,001% плуроника и имеет pH около 8,5. Стадию промывания буфером DF выполняют при коэффициенте концентрации 4. Выход после концентрирования составляет около 90% лизата перед TFF.

**[0196]** Концентрированный клеточный лизат стерильно фильтруют диафильтрацией с использованием фильтров Opticap XL10. Выход клеточного лизата после фильтрации составляет около 95% от клеточного лизата перед стерильной фильтрацией. Лизат клеток можно заморозить и хранить при температуре -80°C.

**[0197]** Перед хроматографической очисткой гAAV клеточный лизат размораживают и фильтруют с использованием мембраны Sartopore 2. Фильтр предварительно промывают и уравнивают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Фильтрацию проводят при давлении около 14,00 фунтов на кв. дюйм со скоростью потока 700 мл/мин. После фильтрации фильтр снова промывают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Для очистки гAAV за аффинной очисткой следует анионообменная очистка.

**[0198]** Для аффинной очистки гAAV используют специфическую для капсида колонку для аффинной очистки. Специфическую для капсида смола для аффинной очистки имеет загрузочную способность от около  $3,4E+13$  вг/мл. Общая связывающая способность специфической для капсида смолы для аффинной очистки составляла около  $1,50E+17$ . В колонку вводят воду для инъекций (ВДИ) и обрабатывают 0,08 М фосфорной кислоты. Затем колонку регенерируют, используя 120 мМ Трис и 2,2 М NaCl. После регенерации колонку уравнивают, используя уравнивающий буфер для аффинной очистки, который содержит около 1,2 мМ лимонной кислоты, 15 мМ фосфата, 300 мМ NaCl, 0,5 % сахарозы, 0,1 % F-68. Лизат клеток загружают в колонку после уравнивания, и после загрузки колонку снова уравнивают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Промывание с высоким содержанием соли проводят с использованием промывочного буфера, который содержит около 1,2 мМ лимонной кислоты, 15 мМ фосфата, 800 мМ NaCl, 0,5% сахарозы, 0,1% F-68. После промывания с высоким содержанием соли колонку перед элюированием уравнивают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Элюирующий буфер для аффинной хроматографии содержит 18 мМ лимонной кислоты, 300 мМ NaCl, 0,5% сахарозы, 0,1 % F-68 при pH 2,6. Сбор элюированного гAAV начинается на пике элюирования около более 60 МАЕ при А280. После элюирования колонку обрабатывают кислотой и регенерируют. Для очистки колонки

используют 5 М гидрохлорида гуанидина при линейной скорости потока около 55 см/ч. Затем колонку промывают водой для инъекций и буфером для хранения, который содержит 1,2 мМ лимонной кислоты, 15 мМ фосфата, 20% этанола при линейной скорости потока 55 см/ч. Буферы и образец, описанные выше, загружают в колонку с линейной скоростью потока около 175 см/ч, если не указано иное. Затем элюированную фракцию нейтрализуют с использованием фосфатного буфера, который содержит 0,6 М фосфата при рН 8,5. Целевой рН элюированной фракции после нейтрализации составляет 7.

**[0199]** При подготовке к анионообменной хроматографии образец из нейтрализованной элюированной фракции после аффинной хроматографии фильтруют с использованием фильтра Kleenpak, разводят и уравнивают с использованием уравнивающего буфера для анионообменной хроматографии, который содержит 20 мМ бис-трис-пропана, 0,0012 % F-68 при рН 9,3 и проводимости менее 2,5 мСм/см. Плотность загрузки колонки составляла от около  $1,0 \times 10^{13}$  до  $4,0 \times 10^{13}$  вг/мл. Перед разведением элюированной фракции колонку для анионообменной хроматографии подготавливают, выполняя следующие стадии: (i) промывают водой для инъекций, (ii) дезинфицируют буфером, содержащим 1 М NaOH и 1,5 М NaCl, (iii) снова промывают водой для инъекций, (iv) промывают элюирующим буфером для анионообменной хроматографии, который содержит 20 мМ бис-триспропана, 0,8 М NaCl, 0,001 % F-68, и (v) уравнивают буфером для уравнивания анионообменной хроматографии, который содержит 20 мМ бис-триспропана, 0,001 % F-68. Как только анионообменная хроматографическая колонка уравновешена, образец загружают в колонку с загрузочным рН около 9,3 и загрузочной проводимостью 1,8 мСм/см. После загрузки колонку снова промывают уравнивающим буфером для анионообменной хроматографии. Образец элюируют сначала уравнивающим буфером для анионообменной хроматографии, а затем элюирующим буфером для анионообменной хроматографии. Сбор фракции, содержащей гAAV, начинается на пике элюирования около более 5 мАЕ при A280 и заканчивается на пике элюирования около менее 20 мАЕ. Затем, элюированную фракцию после анионообменной хроматографии нейтрализуют, используя буфер для нейтрализации CIM QA, который содержит 1 М Трис/HCL при рН около 6,5. Буферы и образцы во время анионообменной хроматографии загружают в колонку при объемной скорости потока 1,5 л/мин, если не указано иное.

**[0200]** После нейтрализации образец концентрируют с помощью TFF и ультрафильтрации/диафильтрации с плотностью загрузки около  $1,37 \times 10^{17}$  вг/м<sup>2</sup> вирусных частиц. Буфер, используемый при фильтрации, содержит Трис, MgCl<sub>2</sub>, NaCl и полоксамер 188.

[0201] Отфильтрованный образец содержит очищенные частицы гAAV и хранится в хранилище BDS при температуре -80 °C. Исходный BDS содержит частицы гAAV с концентрацией около  $1E+13$  вг/мл и может быть разведен до концентрации DP более  $1,0E+13$  вг/мл. Образцы проходят стерилизующую фильтрацию перед упаковкой.

### Пример 6

[0202] Клетки насекомых размораживают и высевают в среду Express Five SFM при концентрации более  $3,0E+05$  жизнеспособных клеток/мл (пассаж 1, P1) для создания посевной культуры. Клетки в посевной культуре культивируют в течение 6 пассажей, а затем высевают в основную биореакцию для получения гAAV.

[0203] Во время основной биореакции указанную выше посевную культуру перемещают в емкость для культивирования N-2 путем смешивания 2 л посевной культуры с Express Five SFM с плотностью около  $4,0E+05$  клеток/мл до общего объема 10 л. Клетки культивируют в емкости для культивирования N-2 в течение 96 часов до достижения плотности культуры более  $5,5E+06$  жк/мл с более чем 90% жизнеспособных клеток. Затем 10 л клеток культуры N-2 перемещают в емкость для культивирования N-1 и смешивали с Express Five SFM при исходной плотности клеток около  $1,5E+06$  жк/мл. Культура N-1 также содержит 10% (об./об.) раствора полоксамера-188. Общий объем в емкости для культивирования N-1 доводят до 50 л путем добавления большего количества среды Express Five SFM. При необходимости в культуру можно добавить пеногаситель. Клетки культивируют в течение 72 часов до достижения конечной плотности более  $6E+06$  жк/мл с более чем 90% жизнеспособных клеток.

[0204] При подготовке к инфицированию гBV культуру N-1 смешивают с SF900 II SFM и добавляют пеногаситель и 10% (об./об.) раствор полоксамера-188. К смеси добавляют Express Five SFM до достижения общего желаемого объема. Соотношение Express Five SFM в смеси на этой стадии составляло около 50% (об./об.). Исходная плотность клеток составляет около  $2E+06$ . Клетки культивируют в течение 96 часов до достижения плотности клеток  $2E+07$ . Затем клетки инфицируют гBV, кодирующим Cap Rep/AAV9, и гBV, кодирующим целевой ген (*например*, GBA, PGRN, PSAP, TREM2 или APOE), с множественностью заражения около 1 инфекционных единиц (ИЕ)/клетка для каждого гBV. Объем каждого гBV, добавленного к культуре, составляет от около 5 до 26 л в зависимости от титра вируса. После добавления к культуре гBV общий объем культуры регулируют с помощью SF900 II SFM таким образом, чтобы процентное содержание Express Five SFM в смеси составляло 40% (об./об.). Примерно через 36 часов после инфицирования в культуру добавляют добавку для повышения продуктивности (РВА) в

количестве около 8% (об./об.). Клетки собирают через около 72 часа после инфицирования. [0205] При сборе клетки насекомых лизируют в Трис-буфере с 0,5% (мас./об.) Тритона. Клетки инкубируют в буфере для лизиса в течение около 75 минут. Лизат клеток обрабатывают бензоназой в концентрации около 60 ИЕ/мл в присутствии около 2 мМ MgCl<sub>2</sub> в течение около 60 мин. Реакцию гасят с помощью около 200 мМ NaCl. Лизат клеток содержит гAAV, упакованный инфицированными клетками насекомых.

[0206] Полученный клеточный лизат затем подвергают стадиям осветления. Первичное осветление осуществляют путем глубинной фильтрации с использованием глубинного фильтра Millistak+<sup>®</sup> HC Pod, серии сред D0HC, площадь поверхности 1,1 м<sup>2</sup> (POD D0HC) при скорости потока промывания около 12 л/мин и максимальном давлении 11 фунтов на кв. дюйм. Затем клеточный лизат очищают глубинной фильтрацией с использованием глубинного фильтра Millistak+<sup>®</sup> HC Pod, серии сред A1HC, площадь поверхности 0,11 м<sup>2</sup> (POD A1HC) при скорости потока промывания около 11 л/мин и давлении около 11 фунтов на кв. дюйм. Затем лизат кондиционируют и прогоняют с использованием Express Five SFM, что дает около 80% клеточного лизата перед стадией осветления. Клеточный лизат концентрируют с помощью TFF. Во время TFF клеточный лизат подвергают промыванию водой, кондиционированию диафильтрационным буфером (буфером DF), промыванию буфером DF и прогону буфера DF. Буфер DF содержит 20 мМ Трис, 500 мМ NaCl и 0,001% плуроника и имеет pH около 8,0. Стадию промывания буфером DF выполняли при коэффициенте концентрации 6. Выход после концентрирования составляет около 90% лизата перед TFF.

[0207] Концентрированный клеточный лизат стерильно фильтруют диафильтрацией с использованием фильтров Opticap XL10. Выход клеточного лизата после фильтрации составляет около 95% от клеточного лизата перед стерильной фильтрацией. Лизат клеток можно заморозить и хранить при температуре -80°C.

[0208] Перед хроматографической очисткой гAAV клеточный лизат размораживают и фильтруют с использованием мембраны Sartopore 2. Фильтр предварительно промывают и уравнивают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Фильтрацию проводят при давлении около 11,00 фунтов на кв. дюйм со скоростью потока 720 мл/мин. После фильтрации фильтр снова промывают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Для очистки гAAV за аффинной очисткой следует анионообменная очистка.

[0209] Для аффинной очистки гAAV используют специфическую для капсида колонку для аффинной очистки. Специфическую для капсида смола для аффинной очистки имеет загрузочную способность от около 4E+13 вг/мл. Общая связывающая способность специфической для капсида смолы для аффинной очистки составляла около 1,50E+17. В

колонку вводят воду для инъекций (ВДИ) и обрабатывают 0,12 М фосфорной кислоты. Затем колонку регенерируют, используя 100 мМ Трис и 1,8 М NaCl. После регенерации колонку уравнивают, используя уравнивающий буфер для аффинной очистки, который содержит около 1 мМ лимонной кислоты, 20 мМ фосфата, 400 мМ NaCl, 0,5 % сахарозы, 0,1 % F-68. Лизат клеток загружают в колонку после уравнивания, и после загрузки колонку снова уравнивают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Промывание с высоким содержанием соли проводят с использованием промывочного буфера, который содержит около 1 мМ лимонной кислоты, 20 мМ фосфата, 800 мМ NaCl, 0,5% сахарозы, 0,1% F-68. После промывания с высоким содержанием соли колонку перед элюированием уравнивают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Элюирующий буфер для аффинной хроматографии содержит 14 мМ лимонной кислоты, 400 мМ NaCl, 0,5% сахарозы, 0,1 % F-68 при pH 2,5. Сбор элюированного gAAV начинается на пике элюирования около более 40 мАЕ при А280. После элюирования колонку обрабатывают кислотой и регенерируют. Для очистки колонки используют 5 М гидрохлорида гуанидина при линейной скорости потока около 70 см/ч. Затем колонку промывают водой для инъекций и буфером для хранения, который содержит 1 мМ лимонной кислоты, 20 мМ фосфата, 20% этанола при линейной скорости потока 70 см/ч. Буферы и образец, описанные выше, загружают в колонку с линейной скоростью потока около 150 см/ч, если не указано иное. Затем элюированную фракцию нейтрализуют с использованием фосфатного буфера, который содержит 0,3 М фосфата при pH 9,0. Целевой pH элюированной фракции после нейтрализации составляет 7,5.

**[0210]** При подготовке к анионообменной хроматографии образец из нейтрализованной элюированной фракции после аффинной хроматографии фильтруют с использованием фильтра Kleenpak, разводят и уравнивают с использованием уравнивающего буфера для анионообменной хроматографии, который содержит 12 мМ бис-трис-пропана, 0,0012 % F-68 при pH 8,8 и проводимости менее 2 мСм/см. Плотность загрузки колонки составляла от около  $1,0 \times 10^{13}$  до  $4,0 \times 10^{13}$  вг/мл. Перед разведением элюированной фракции колонку для анионообменной хроматографии подготавливают, выполняя следующие стадии: (i) промывают водой для инъекций, (ii) дезинфицируют буфером, содержащим 1,2 М NaOH и 1,8 М NaCl, (iii) снова промывают водой для инъекций, (iv) промывают элюирующим буфером для анионообменной хроматографии, который содержит 12 мМ бис-триспропана, 1,5 М NaCl, 0,001 % F-68, и (v) уравнивают буфером для уравнивания анионообменной хроматографии, который содержит 12 мМ бис-триспропана, 0,0012 % F-68. Как только анионообменная хроматографическая колонка уравновешена, образец загружают в колонку с загрузочным pH около 8,8 и загрузочной

проводимостью 2,5 мСм/см. После загрузки колонку снова промывают уравнивающим буфером для анионообменной хроматографии. Образец элюируют сначала уравнивающим буфером для анионообменной хроматографии, а затем элюирующим буфером для анионообменной хроматографии. Сбор фракции, содержащей гAAV, начинается на пике элюирования около более 5 мАЕ при А280 и заканчивается на пике элюирования около менее 18 мАЕ. Затем, элюированную фракцию после анионообменной хроматографии нейтрализуют, используя буфер для нейтрализации CIM QA, который содержит 0,8 М Трис/HCL при pH около 5,8. Буферы и образцы во время анионообменной хроматографии загружают в колонку при объемной скорости потока 1,5 л/мин, если не указано иное.

**[0211]** После нейтрализации образец концентрируют путем тангенциальной проточной фильтрации и ультрафильтрации/диафильтрации с плотностью загрузки от около  $1,4E+17$  вг/м<sup>2</sup> вирусных частиц. Буфер, используемый при фильтрации, содержит Трис, MgCl<sub>2</sub>, NaCl и полоксамер 188.

**[0212]** Отфильтрованный образец содержит очищенные частицы гAAV и хранится в хранилище BDS при температуре -80 °C. Исходный BDS содержит частицы гAAV с концентрацией около  $1E+13$  вг/мл и может быть разведен до концентрации DP более  $1,0E+13$  вг/мл. Образцы проходят стерилизующую фильтрацию перед упаковкой.

### **Пример 7**

**[0213]** Клетки насекомых размораживают и высевают в среду ESF-921 при концентрации более  $3,0E+05$  жизнеспособных клеток/мл (пассаж 1, P1) для создания посевной культуры. Клетки в посевной культуре культивируют в течение 4 пассажей, а затем высевают в основную биореакцию для получения гAAV.

**[0214]** Во время основной биореакции указанную выше посевную культуру перемещают в емкость для культивирования N-2 путем смешивания 2 л посевной культуры с ESF-921 с плотностью около  $3,0E+05$  клеток/мл до общего объема 10 л. Клетки культивируют в емкости для культивирования N-2 в течение 96 часов до достижения плотности культуры более  $5,5E+06$  жк/мл с более чем 80% жизнеспособных клеток. Затем 10 л клеток культуры N-2 перемещают в емкость для культивирования N-1 и смешивали с ESF-921 при исходной плотности клеток около  $1,5E+06$  жк/мл. Культура N-1 также содержит 10% (об./об.) раствора полоксамера-188. Общий объем в емкости для культивирования N-1 доводят до 50 л путем добавления большего количества ESF-921. При необходимости в культуру можно добавить пеногаситель. Клетки культивируют в течение 72 часов до достижения конечной плотности более  $6.5E+06$  жк/мл с более чем 80% жизнеспособных клеток.

**[0215]** При подготовке к инфицированию гBV культуру N-1 смешивают с basuloGROW и добавляют пеногаситель и 10% (об./об.) раствор полоксамера-188. К смеси добавляют ESF-921 до достижения общего желаемого объема. Соотношение ESF-921 в смеси на этой стадии составляет около 40% (об./об.). Исходная плотность клеток составляет около  $2E+06$ . Клетки культивируют в течение 96 часов до достижения плотности клеток  $1.5E+07$ . Затем клетки инфицируют гBV, кодирующим Cap Rep/AAV9, и гBV, кодирующим целевой ген (*например*, GBA, PGRN, PSAP, TREM2 или APOE), с множественностью заражения около 2 инфекционных единиц (ИЕ)/клетка для каждого гBV. Объем каждого гBV, добавленного к культуре, составляет от около 5 до 26 л в зависимости от титра вируса. После добавления к культуре гBV общий объем культуры регулируют с помощью basuloGROW таким образом, чтобы процентное содержание ESF-921 в смеси составляло 40% (об./об.). Примерно через 24 часа после инфицирования в культуру добавляют добавку для повышения продуктивности (РВА) в количестве около 5% (об./об.). Клетки собирают через около 96 часа после инфицирования.

**[0216]** При сборе клетки насекомых лизируют в Трис-буфере с 0,5% (мас./об.) Тритона. Клетки инкубируют в буфере для лизиса в течение около 75 минут. Лизат клеток обрабатывают бензоназой в концентрации около 60 ИЕ/мл в присутствии около 2 мМ  $MgCl_2$  в течение около 60 мин. Реакцию гасят с помощью около 200 мМ NaCl. Лизат клеток содержит гAAV, упакованный инфицированными клетками насекомых.

**[0217]** Полученный клеточный лизат затем подвергают стадиям осветления. Первичное осветление осуществляют путем глубинной фильтрации с использованием глубинного фильтра Millistak+® HC Pod, серии сред D0HC, площадь поверхности  $1,1 \text{ м}^2$  (POD D0HC) при скорости потока промывания около 12 л/мин и максимальном давлении 14 фунтов на кв. дюйм. Затем клеточный лизат очищают глубинной фильтрацией с использованием глубинного фильтра Millistak+® HC Pod, серии сред A1HC, площадь поверхности  $0,11 \text{ м}^2$  (POD A1HC) при скорости потока промывания около 12 л/мин и давлении около 14 фунтов на кв. дюйм. Затем лизат кондиционировали и прогоняют с использованием ESF-921, что дает около 80% клеточного лизата перед стадией осветления. Клеточный лизат концентрируют с помощью TFF. Во время TFF клеточный лизат подвергают промыванию водой, кондиционированию диафильтрационным буфером (буфером DF), промыванию буфером DF и прогону буфера DF. Буфер DF содержит 20 мМ Трис, 500 мМ NaCl и 0,001% плуроника и имеет pH около 8,0. Стадию промывания буфером DF выполняют при коэффициенте концентрации 8. Выход после концентрирования составляет около 80% лизата перед TFF.

**[0218]** Концентрированный клеточный лизат стерильно фильтруют диафильтрацией с

использованием фильтров Opticar XL10. Выход клеточного лизата после фильтрации составляет около 90% от клеточного лизата перед стерильной фильтрацией. Лизат клеток можно заморозить и хранить при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**[0219]** Перед хроматографической очисткой гAAV клеточный лизат размораживают и фильтруют с использованием мембраны Sartopore 2. Фильтр предварительно промывали и уравнивали уравнивающим буфером для аффинной очистки. Фильтрацию проводят при давлении около 14,00 фунтов на кв. дюйм со скоростью потока 750 мл/мин. После фильтрации фильтр снова промывают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Для очистки гAAV за аффинной очисткой следует анионообменная очистка.

**[0220]** Для аффинной очистки гAAV используют специфическую для капсида колонку для аффинной очистки. Специфическую для капсида смола для аффинной очистки имеет загрузочную способность от около  $3\text{E}+13$  вг/мл. Общая связывающая способность специфической для капсида смолы для аффинной очистки составляла около  $1,60\text{E}+17$ . В колонку вводят воду для инъекций (ВДИ) и обрабатывают 0,12 М фосфорной кислоты. Затем колонку регенерируют, используя 120 мМ Трис и 1,8 М NaCl. После регенерации колонку уравнивают, используя уравнивающий буфер для аффинной очистки, который содержит около 1,2 мМ лимонной кислоты, 16 мМ фосфата, 350 мМ NaCl, 0,4 % сахарозы, 0,1 % F-68. Лизат клеток загружают в колонку после уравнивания, и после загрузки колонку снова уравнивают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Промывание с высоким содержанием соли проводят с использованием промывочного буфера, который содержит около 1,2 мМ лимонной кислоты, 16 мМ фосфата, 1000 мМ NaCl, 0,5% сахарозы, 0,1% F-68. После промывания с высоким содержанием соли колонку перед элюированием уравнивают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Элюирующий буфер для аффинной хроматографии содержит 18 мМ лимонной кислоты, 350 мМ NaCl, 0,4% сахарозы, 0,1 % F-68 при pH 2,2. Сбор элюированного гAAV начинается на пике элюирования около более 50 мАЕ при А280. После элюирования колонку обрабатывают кислотой и регенерируют. Для очистки колонки используют 6 М гидрохлорида гуанидина при линейной скорости потока около 50 см/ч. Затем колонку промывают водой для инъекций и буфером для хранения, который содержит 1,2 мМ лимонной кислоты, 16 мМ фосфата, 20% этанола при линейной скорости потока 50 см/ч. Буферы и образец, описанные выше, загружают в колонку с линейной скоростью потока около 130 см/ч, если не указано иное. Затем элюированную фракцию нейтрализуют с использованием фосфатного буфера, который содержит 0,3 М фосфата при pH 9,5. Целевой pH элюированной фракции после нейтрализации составляет 7,5.

**[0221]** При подготовке к анионообменной хроматографии образец из нейтрализованной

элюированной фракции после аффинной хроматографии фильтруют с использованием фильтра Kleenpak, разводят и уравнивают с использованием уравнивающего буфера для анионообменной хроматографии, который содержит 18 мМ бис-трис-пропана, 0,0012 % F-68 при pH 9,2 и проводимости менее 3 мСм/см. Плотность загрузки колонки составляла от около  $1,0 \times 10^{13}$  до  $4,0 \times 10^{13}$  вг/мл. Перед разведением элюированной фракции колонку для анионообменной хроматографии подготавливают, выполняя следующие стадии: (i) промывают водой для инъекций, (ii) дезинфицируют буфером, содержащим 1 М NaOH и 1,8 М NaCl, (iii) снова промывают водой для инъекций, (iv) промывают элюирующим буфером для анионообменной хроматографии, который содержит 18 мМ бис-триспропана, 1 М NaCl, 0,001 % F-68, и (v) уравнивают буфером для уравнивания анионообменной хроматографии, который содержит 18 мМ бис-трис-пропана, 0,001 % F-68. Как только анионообменная хроматографическая колонка уравновешена, образец загружают в колонку с загрузочным pH около 9,2 и загрузочной проводимостью 3 мСм/см. После загрузки колонку снова промывают уравнивающим буфером для анионообменной хроматографии. Образец элюируют сначала уравнивающим буфером для анионообменной хроматографии, а затем элюирующим буфером для анионообменной хроматографии. Сбор фракции, содержащей гAAV, начинается на пике элюирования около более 5 мАЕ при A280 и заканчивается на пике элюирования около менее 18 мАЕ. Затем, элюированную фракцию после анионообменной хроматографии нейтрализуют, используя буфер для нейтрализации CIM QA, который содержит 0,8 М Трис/HCL при pH около 5,8. Буферы и образцы во время анионообменной хроматографии загружают в колонку при объемной скорости потока 1,5 л/мин, если не указано иное.

**[0222]** После нейтрализации образец концентрируют путем тангенциальной проточной фильтрации и ультрафильтрации/диафильтрации с плотностью загрузки от около  $1,4 \times 10^{17}$  вг/м<sup>2</sup> вирусных частиц. Буфер, используемый при фильтрации, содержит Трис, MgCl<sub>2</sub>, NaCl и полоксамер 188.

**[0223]** Отфильтрованный образец содержит очищенные частицы гAAV и хранится в хранилище BDS при температуре -80 °C. Исходный BDS содержит частицы гAAV с концентрацией около  $1 \times 10^{13}$  вг/мл и может быть разведен до концентрации DP более  $1,0 \times 10^{13}$  вг/мл. Образцы проходят стерилизующую фильтрацию перед упаковкой.

### **Пример 8**

**[0224]** Клетки насекомых размораживают и высевают в baculoGROW при концентрации более  $3,0 \times 10^5$  жизнеспособных клеток/мл (пассаж 1, P1) для создания посевной культуры. Клетки в посевной культуре культивируют в течение 6 пассажей, а затем высевают в

основную биореакцию для получения гAAV.

**[0225]** Во время основной биореакции указанную выше посевную культуру перемещают в емкость для культивирования N-2 путем смешивания 2 л посевной культуры с baculoGROW с плотностью около  $3,0E+05$  клеток/мл до общего объема 10 л. Клетки культивируют в емкости для культивирования N-2 в течение 96 часов до достижения плотности культуры более  $5,5E+06$  жк/мл с более чем 90% жизнеспособных клеток. Затем 10 л клеток культуры N-2 перемещают в емкость для культивирования N-1 и смешивали с baculoGROW при исходной плотности клеток около  $1,5E+06$  жк/мл. Культура N-1 также содержит 5% (об./об.) раствора полоксамера-188. Общий объем в емкости для культивирования N-1 доводят до 50 л путем добавления большего количества baculoGROW. При необходимости в культуру можно добавить пеногаситель. Клетки культивируют в течение 72 часов до достижения конечной плотности более  $6,5E+06$  жк/мл с более чем 90% жизнеспособных клеток.

**[0226]** При подготовке к инфицированию гBV культуру N-1 смешивают с ESF AF и добавляют пеногаситель и 5% (об./об.) раствор полоксамера-188. baculoGROW добавляют к смеси до достижения желаемого общего объема. Соотношение baculoGROW в смеси на этой стадии составляет около 30% (об./об.). Исходная плотность клеток составляет около  $2E+06$ . Клетки культивируют в течение 96 часов до достижения плотности клеток  $1,5E+07$ . Затем клетки инфицируют гBV, кодирующим Cap Rep/AAV9, и гBV, кодирующим целевой ген (*например*, GBA, PGRN, PSAP, TREM2 или APOE), с множественностью заражения около 1,8 инфекционных единиц (ИЕ)/клетка для каждого гBV. Объем каждого гBV, добавленного к культуре, составляет от около 5 до 26 л в зависимости от титра вируса. После добавления к культуре гBV общий объем культуры регулируют с помощью ESF AF таким образом, чтобы процентное содержание baculoGROW в смеси составляло 40% (об./об.). Примерно через 36 часов после инфицирования в культуру добавляют добавку для повышения продуктивности (РВА) в количестве около 8% (об./об.). Клетки собирают через около 120 часа после инфицирования.

**[0227]** При сборе клетки насекомых лизируют в Трис-буфере с 0,8% (мас./об.) Тритона. Клетки инкубируют в буфере для лизиса в течение около 60 минут. Лизат клеток обрабатывают бензоназой в концентрации около 60 ИЕ/мл в присутствии около 2,5 мМ  $MgCl_2$  в течение около 60 мин. Реакцию гасят с помощью около 280 мМ NaCl. Лизат клеток содержит гAAV, упакованный инфицированными клетками насекомых.

**[0228]** Полученный клеточный лизат затем подвергают стадиям осветления. Первичное осветление осуществляют путем глубинной фильтрации с использованием глубинного фильтра Millistak+<sup>®</sup> HC Pod, серии сред D0HC, площадь поверхности  $1,1 \text{ м}^2$  (POD D0HC)

при скорости потока промывания около 15 л/мин и максимальном давлении менее около 12 фунтов на кв. дюйм. Затем клеточный лизат очищают глубинной фильтрацией с использованием глубинного фильтра Millistak+® HC Pod, серии сред A1HC, площадь поверхности 0,11 м<sup>2</sup> (POD A1HC) при скорости потока промывания около 15/мин и давлении менее около 12 фунтов на кв. дюйм. Затем лизат кондиционировали и прогоняют с использованием baculoGROW, что дает около 85% клеточного лизата перед стадией осветления. Клеточный лизат концентрируют с помощью TFF. Во время TFF клеточный лизат подвергают промыванию водой, кондиционированию диафильтрационным буфером (буфером DF), промыванию буфером DF и прогону буфера DF. Буфер DF содержит 20 мМ Трис, 500 мМ NaCl и 0,001% плуроника и имеет рН около 8,0. Стадию промывания буфером DF выполняют при коэффициенте концентрации 3. Выход после концентрирования составляет около 75% лизата перед TFF.

**[0229]** Концентрированный клеточный лизат стерильно фильтруют диафильтрацией с использованием фильтров Opticap XL10. Выход клеточного лизата после фильтрации составляет около 80% от клеточного лизата перед стерильной фильтрацией. Лизат клеток можно заморозить и хранить при температуре -80°C.

**[0230]** Перед хроматографической очисткой гAAV клеточный лизат размораживают и фильтруют с использованием мембраны Sartopore 2. Фильтр предварительно промывают и уравнивают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Фильтрацию проводят при давлении около 12,00 фунтов на кв. дюйм со скоростью потока 780 мл/мин. После фильтрации фильтр снова промывают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Для очистки гAAV за аффинной очисткой следует анионообменная очистка.

**[0231]** Для аффинной очистки гAAV используют специфическую для капсида колонку для аффинной очистки. Специфическую для капсида смола для аффинной очистки имеет грузочную способность от около 2.5E+13 вг/мл. Общая связывающая способность специфической для капсида смолы для аффинной очистки составляла около 1E+17. В колонку вводят воду для инъекций (ВДИ) и обрабатывают 0,12 М фосфорной кислоты. Затем колонку регенерируют, используя 100 мМ Трис и 1,8 М NaCl. После регенерации колонку уравнивают, используя уравнивающий буфер для аффинной очистки, который содержит около 1 мМ лимонной кислоты, 22 мМ фосфата, 320 мМ NaCl, 0,5 % сахарозы, 0,1 % F-68. Лизат клеток загружают в колонку после уравнивания, и после загрузки колонку снова уравнивают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Промывание с высоким содержанием соли проводят с использованием промывочного буфера, который содержит около 1 мМ лимонной кислоты, 22 мМ фосфата, 1000 мМ NaCl, 0,5% сахарозы, 0,1% F-68. После промывания с высоким содержанием соли

колонку перед элюированием уравнивают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Элюирующий буфер для аффинной хроматографии содержит 15 мМ лимонной кислоты, 320 мМ NaCl, 0,5% сахарозы, 0,1 % F-68 при pH 2,5. Сбор элюированного rAAV начинается на пике элюирования около более 50 мАЕ при A280. После элюирования колонку обрабатывают кислотой и регенерируют. Для очистки колонки используют 6 М гидрохлорида гуанидина при линейной скорости потока около 60 см/ч. Затем колонку промывают водой для инъекций и буфером для хранения, который содержит 1 мМ лимонной кислоты, 22 мМ фосфата, 20% этанола при линейной скорости потока 70 см/ч. Буферы и образец, описанные выше, загружают в колонку с линейной скоростью потока около 150 см/ч, если не указано иное. Затем элюированную фракцию нейтрализуют с использованием фосфатного буфера, который содержит 0,5 М фосфата при pH 8,5. Целевой pH элюированной фракции после нейтрализации составляет 7,5.

**[0232]** При подготовке к анионообменной хроматографии образец из нейтрализованной элюированной фракции после аффинной хроматографии фильтруют с использованием фильтра Kleenpak, разводят и уравнивают с использованием уравнивающего буфера для анионообменной хроматографии, который содержит 22 мМ бис-трис-пропана, 0,001 % F-68 при pH 9,2 и проводимости менее 3 мСм/см. Плотность загрузки колонки составляла от около  $1,0 \times 10^{13}$  до  $4,0 \times 10^{13}$  вг/мл. Перед разведением элюированной фракции колонку для анионообменной хроматографии подготавливают, выполняя следующие стадии: (i) промывают водой для инъекций, (ii) дезинфицируют буфером, содержащим 1 М NaOH и 1,8 М NaCl, (iii) снова промывают водой для инъекций, (iv) промывают элюирующим буфером для анионообменной хроматографии, который содержит 22 мМ бис-триспропана, 1,8 М NaCl, 0,001 % F-68, и (v) уравнивают буфером для уравнивания анионообменной хроматографии, который содержит 22 мМ бис-триспропана, 0,0012 % F-68. Как только анионообменная хроматографическая колонка уравновешена, образец загружают в колонку с загрузочным pH около 9,2 и загрузочной проводимостью 2 мСм/см. После загрузки колонку снова промывают уравнивающим буфером для анионообменной хроматографии. Образец элюируют сначала уравнивающим буфером для анионообменной хроматографии, а затем элюирующим буфером для анионообменной хроматографии. Сбор фракции, содержащей rAAV, начинается на пике элюирования около более 5 мАЕ при A280 и заканчивается на пике элюирования около менее 15 мАЕ. Элюированную фракцию после анионообменной хроматографии затем нейтрализуют с использованием нейтрализующего буфера CIM QA, который содержит 0,5 М Трис/HCL при pH около 6. Буферы и образцы во время анионообменной хроматографии загружают в колонку при объемной скорости потока 1,5

л/мин, если не указано иное.

**[0233]** После нейтрализации образец концентрируют путем тангенциальной проточной фильтрации и ультрафильтрации/диафильтрации с плотностью загрузки от около  $1,4E+17$  вг/м<sup>2</sup> вирусных частиц. Буфер, используемый при фильтрации, содержит Трис, MgCl<sub>2</sub>, NaCl и полоксамер 188.

**[0234]** Отфильтрованный образец содержит очищенные частицы гAAV и хранится в хранилище BDS при температуре -80 °С. Исходный BDS содержит частицы гAAV с концентрацией около  $1E+13$  вг/мл и может быть разведен до концентрации DP более  $1,0E+13$  вг/мл. Образцы проходят стерилизующую фильтрацию перед упаковкой.

### Пример 9

**[0235]** Клетки насекомых размораживают и высевают в среду ExpiSf CD при концентрации более  $3,0E+05$  жизнеспособных клеток/мл (пассаж 1, P1) для создания посевной культуры. Клетки в посевной культуре культивируют в течение 5 пассажей, а затем высевают в основную биореакцию для получения гAAV.

**[0236]** Во время основной биореакции указанную выше посевную культуру перемещают в емкость для культивирования N-2 путем смешивания 2 л посевной культуры с средой ExpiSf CD с плотностью около  $6,0E+05$  клеток/мл до общего объема 10 л. Клетки культивируют в емкости для культивирования N-2 в течение 96 часов до достижения плотности культуры более  $6E+06$  жк/мл с более чем 90% жизнеспособных клеток. Затем 10 л клеток культуры N-2 перемещают в емкость для культивирования N-1 и смешивали с средой ExpiSf CD при исходной плотности клеток около  $1,5E+06$  жк/мл. Культура N-1 также содержит 10% (об./об.) раствора полоксамера-188. Общий объем в емкости для культивирования N-1 доводят до 50 л путем добавления большего количества среды ExpiSf CD. При необходимости в культуру можно добавить пеногаситель. Клетки культивируют в течение 72 часов до достижения конечной плотности более  $6E+06$  жк/мл с более чем 85% жизнеспособных клеток.

**[0237]** При подготовке к инфицированию рекомбинантным бакуловирусом (гBV) культуру N-1 смешивают с SF900 II SFM и добавляют пеногаситель и 10% (об./об.) раствор полоксамера-188. К смеси добавляют среду ExpiSf CD до достижения общего желаемого объема. Соотношение среды ExpiSf CD в смеси на этой стадии составляет около 40% (об./об.). Исходная плотность клеток составляет около  $2E+06$ . Клетки культивируют в течение 96 часов до достижения плотности клеток  $1.5E+07$ . Затем клетки инфицируют гBV, кодирующим Cap Rep/AAV9, и гBV, кодирующим целевой ген (*например*, GBA, PGRN, PSAP, TREM2 или APOE), с множественностью заражения около 1,6 инфекционных

единиц (ИЕ)/клетка для каждого гBV. Объем каждого гBV, добавленного к культуре, составляет от около 5 до 26 л в зависимости от титра вируса. После добавления к культуре гBV общий объем культуры регулировали с помощью SF900 II SFM таким образом, чтобы процентное содержание среды ExriSf CD в смеси составляло 40% (об./об.). Примерно через 20 часов после инфицирования в культуру добавляют добавку для повышения продуктивности (РВА) в количестве около 8% (об./об.). Клетки собирают через около 60 часа после инфицирования.

**[0238]** При сборе клетки насекомых лизируют в Трис-буфере с 0,4% (мас./об.) Тритона. Клетки инкубируют в буфере для лизиса в течение около 75 минут. Лизат клеток обрабатывают бензоазой в концентрации около 50 ИЕ/мл в присутствии около 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub> в течение около 60 мин. Реакцию гасят с помощью около 150 мМ NaCl. Лизат клеток содержит гAAV, упакованный инфицированными клетками насекомых.

**[0239]** Полученный клеточный лизат затем подвергают стадиям осветления. Первичное осветление осуществляют путем глубинной фильтрации с использованием глубинного фильтра Millistak+® HC Pod, серии сред D0HC, площадь поверхности 1,1 м<sup>2</sup> (POD D0HC) при скорости потока промывания около 15 л/мин и максимальном давлении 13 фунтов на кв. дюйм. Затем клеточный лизат очищают глубинной фильтрацией с использованием глубинного фильтра Millistak+® HC Pod, серии сред A1HC, площадь поверхности 0,11 м<sup>2</sup> (POD A1HC) при скорости потока промывания около 12 л/мин и давлении около 13 фунтов на кв. дюйм. Затем лизат кондиционируют и прогоняют с использованием среды ExriSf CD, что дает около 95% клеточного лизата перед стадией осветления. Клеточный лизат концентрируют с помощью тангенциальной проточной фильтрацией (TFF). Во время TFF клеточный лизат подвергают промыванию водой, кондиционированию диафильтрационным буфером (буфером DF), промыванию буфером DF и прогону буфера DF. Буфер DF содержит 20 мМ Трис, 500 мМ NaCl и 0,001% плуроника и имеет pH около 8,0. Стадию промывания буфером DF выполняют при коэффициенте концентрации 6. Выход после концентрирования составляет около 75% лизата перед TFF.

**[0240]** Концентрированный клеточный лизат стерильно фильтруют диафильтрацией с использованием фильтров Opticor XL10. Выход клеточного лизата после фильтрации составляет около 95% от клеточного лизата перед стерильной фильтрацией. Лизат клеток можно заморозить и хранить при температуре -80°C.

**[0241]** Перед хроматографической очисткой гAAV клеточный лизат размораживают и фильтруют с использованием мембраны Sartopore 2. Фильтр предварительно промывают и уравнивают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Фильтрацию проводят при давлении около 13,00 фунтов на кв. дюйм со скоростью потока 720 мл/мин.

После фильтрации фильтр снова промывают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Для очистки гААV за аффинной очисткой следует анионообменная очистка.

**[0242]** Для аффинной очистки гААV используют специфическую для капсида колонку для аффинной очистки. Специфическую для капсида смола для аффинной очистки имеет загрузочную способность от около  $3,4E+13$  вг/мл. Общая связывающая способность специфической для капсида смолы для аффинной очистки составляла около  $1E+17$ . В колонку вводят воду для инъекций (ВДИ) и обрабатывают 0,12 М фосфорной кислоты. Затем колонку регенерируют, используя 90 мМ Трис и 1,8 М NaCl. После регенерации колонку уравнивают, используя уравнивающий буфер для аффинной очистки, который содержит около 1,5 мМ лимонной кислоты, 22 мМ фосфата, 360 мМ NaCl, 0,5 % сахарозы, 0,2 % F-68. Лизат клеток загружают в колонку после уравнивания, и после загрузки колонку снова уравнивают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Промывание с высоким содержанием соли проводят с использованием промывочного буфера, который содержит около 1,5 мМ лимонной кислоты, 22 мМ фосфата, 1500 мМ NaCl, 0,5% сахарозы, 0,1% F-68. После промывания с высоким содержанием соли колонку перед элюированием уравнивают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Элюирующий буфер для аффинной хроматографии содержит 18 мМ лимонной кислоты, 360 мМ NaCl, 0,5% сахарозы, 0,2 % F-68 при pH 2,5. Сбор элюированного гААV начинается на пике элюирования около более 30 мАЕ при А280. После элюирования колонку обрабатывают кислотой и регенерируют. Для очистки колонки используют 6 М гидрохлорида гуанидина при линейной скорости потока около 80 см/ч. Затем колонку промывают водой для инъекций и буфером для хранения, который содержит 1,5 мМ лимонной кислоты, 22 мМ фосфата, 20% этанола при линейной скорости потока 80 см/ч. Буферы и образец, описанные выше, загружают в колонку с линейной скоростью потока около 120 см/ч, если не указано иное. Затем элюированную фракцию нейтрализуют с использованием фосфатного буфера, который содержит 0,5 М фосфата при pH 8,5. Целевой pH элюированной фракции после нейтрализации составляет 6,8.

**[0243]** При подготовке к анионообменной хроматографии образец из нейтрализованной элюированной фракции после аффинной хроматографии фильтруют с использованием фильтра Kleenpak, разводят и уравнивают с использованием уравнивающего буфера для анионообменной хроматографии, который содержит 20 мМ бис-трис-пропана, 0,001 % F-68 при pH 8,8 и проводимости менее 2,5 мСм/см. Плотность загрузки колонки составляла от около  $1,0+E13$  до  $4,0+E13$  вг/мл. Перед разведением элюированной фракции колонку для анионообменной хроматографии подготавливают, выполняя следующие стадии: (i) промывают водой для инъекций, (ii) дезинфицируют буфером, содержащим 1 М

NaOH и 1,8 М NaCl, (iii) снова промывают водой для инъекций, (iv) промывают элюирующим буфером для анионообменной хроматографии, который содержит 20 мМ бис-триспропана, 1,8 М NaCl, 0,001 % F-68, и (v) уравнивают буфером для уравнивания анионообменной хроматографии, который содержит 20 мМ бис-триспропана, 0,0012 % F-68. Как только анионообменная хроматографическая колонка уравновешена, образец загружают в колонку с загрузочным рН около 8,8 и загрузочной проводимостью 2,5 мСм/см. После загрузки колонку снова промывают уравнивающим буфером для анионообменной хроматографии. Образец элюируют сначала уравнивающим буфером для анионообменной хроматографии, а затем элюирующим буфером для анионообменной хроматографии. Сбор фракции, содержащей гAAV, начинается на пике элюирования около более 5 мАЕ при А280 и заканчивается на пике элюирования около менее 15 мАЕ. Затем, элюированную фракцию после анионообменной хроматографии нейтрализуют, используя буфер для нейтрализации С1М QА, который содержит 1 М Трис/НСL при рН около 6. Буферы и образцы во время анионообменной хроматографии загружают в колонку при объемной скорости потока 1,5 л/мин, если не указано иное.

**[0244]** После нейтрализации образец концентрируют путем тангенциальной проточной фильтрации и ультрафильтрации/диафильтрации с плотностью загрузки от около  $1,39E+17$  вг/м<sup>2</sup> вирусных частиц. Буфер, используемый при фильтрации, содержит Трис, MgCl<sub>2</sub>, NaCl и полоксамер 188.

**[0245]** Отфильтрованный образец содержит очищенные частицы гAAV и хранится в хранилище BDS при температуре -80 °С. Исходный BDS содержит частицы гAAV с концентрацией около  $3,0E+13$  вг/мл и может быть разведен до концентрации DP более  $1,0E+13$  вг/мл. Образцы проходят стерилизующую фильтрацию перед упаковкой.

### **Пример 10**

**[0246]** Клетки насекомых размораживают и высевают в SF900 II SFM при концентрации более  $3,0E+05$  жизнеспособных клеток/мл (пассаж 1, P1) для создания посевной культуры. Клетки в посевной культуре культивируют в течение 5 пассажей, а затем высевают в основную биореакцию для получения гAAV.

**[0247]** Во время основной биореакции указанную выше посевную культуру перемещают в емкость для культивирования N-2 путем смешивания 2 л посевной культуры с SF900 II SFM с плотностью около  $4,8E+05$  клеток/мл до общего объема 10 л. Клетки культивируют в емкости для культивирования N-2 в течение 96 часов до достижения плотности культуры более  $4,8E+06$  жк/мл с более чем 90% жизнеспособных клеток. Затем 10 л клеток культуры

N-2 перемещают в емкость для культивирования N-1 и смешивали с SF-900 II SFM при исходной плотности клеток около  $2E+06$  жк/мл. Культура N-1 также содержала 8% (об./об.) раствора полоксамера-188. Общий объем в емкости для культивирования N-1 доводят до 50 л путем добавления большего количества среды SF900 II SFM. При необходимости в культуру можно добавить пеногаситель. Клетки культивируют в течение 72 часов до достижения конечной плотности более  $6E+06$  жк/мл с более чем 90% жизнеспособных клеток.

**[0248]** При подготовке к инфицированию гBV культуру N-1 смешивают с IS SF и добавляют пеногаситель и 8% (об./об.) раствор полоксамера-188. К смеси добавляют SF900 II SFM до достижения общего желаемого объема. Соотношение SF900 II SFM в смеси на этой стадии составляло около 45% (об./об.). Исходная плотность клеток составляет около  $2E+06$ . Клетки культивируют в течение 96 часов до достижения плотности клеток  $1.5E+07$ . Затем клетки инфицируют гBV, кодирующим Cap Rep/AAV9, и гBV, кодирующим целевой ген (*например*, GBA, PGRN, PSAP, TREM2 или APOE), с множественностью заражения около 1,5 инфекционных единиц (ИЕ)/клетка для каждого гBV. Объем каждого гBV, добавленного к культуре, составляет от около 5 до 26 л в зависимости от титра вируса. После добавления к культуре гBV общий объем культуры регулируют с помощью IS SF таким образом, чтобы процентное содержание SF900 II SFM в смеси составляло 40% (об./об.). Примерно через 18 часов после инфицирования в культуру добавляют добавку для повышения продуктивности (РВА) в количестве около 8% (об./об.). Клетки собирают через около 72 часа после инфицирования.

**[0249]** При сборе клетки насекомых лизируют в Трис-буфере с 0,5% (мас./об.) Тритона. Клетки инкубируют в буфере для лизиса в течение около 75 минут. Лизат клеток обрабатывают бензоназой в концентрации около 50 ИЕ/мл в присутствии около 2,5 мМ  $MgCl_2$  в течение около 60 мин. Реакцию гасят с помощью около 280 мМ NaCl. Лизат клеток содержит гAAV, упакованный инфицированными клетками насекомых.

**[0250]** Полученный клеточный лизат затем подвергают стадиям осветления. Первичное осветление осуществляют путем глубинной фильтрации с использованием глубинного фильтра Millistak+® HC Pod, серии сред D0HC, площадь поверхности  $1,1 \text{ м}^2$  (POD D0HC) при скорости потока промывания около 20 л/мин и максимальном давлении 11 фунтов на кв. дюйм. Затем клеточный лизат очищают глубинной фильтрацией с использованием глубинного фильтра Millistak+® HC Pod, серии сред A1HC, площадь поверхности  $0,11 \text{ м}^2$  (POD A1HC) при скорости потока промывания около 20 л/мин и давлении около 11 фунтов на кв. дюйм. Затем лизат кондиционируют и прогоняют с использованием SF900 II SFM, что дает около 95% клеточного лизата перед стадией осветления. Клеточный лизат

концентрируют с помощью TFF. Во время TFF клеточный лизат подвергают промыванию водой, кондиционированию диафильтрационным буфером (буфером DF), промыванию буфером DF и прогону буфера DF. Буфер DF содержит 20 мМ Трис, 500 мМ NaCl и 0,001% плюроники и имеет pH около 8,0. Стадию промывания буфером DF выполняют при коэффициенте концентрации 6. Выход после концентрирования составляет около 90% лизата перед TFF.

**[0251]** Концентрированный клеточный лизат стерильно фильтруют диафильтрацией с использованием фильтров Opticap XL10. Выход клеточного лизата после фильтрации составляет около 95% от клеточного лизата перед стерильной фильтрацией. Лизат клеток можно заморозить и хранить при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**[0252]** Перед хроматографической очисткой gAAV клеточный лизат размораживают и фильтруют с использованием мембраны Sartopore 2. Фильтр предварительно промывают и уравнивают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Фильтрацию проводят при давлении около 13,00 фунтов на кв. дюйм со скоростью потока 750 мл/мин. После фильтрации фильтр снова промывают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Для очистки gAAV за аффинной очисткой следует анионообменная очистка.

**[0253]** Для аффинной очистки gAAV используют специфическую для капсида колонку для аффинной очистки. Специфическую для капсида смола для аффинной очистки имеет загрузочную способность от около  $4\text{E}+13$  вг/мл. Общая связывающая способность специфической для капсида смолы для аффинной очистки составляла около  $2\text{E}+17$ . В колонку вводят воду для инъекций (ВДИ) и обрабатывают 0,06 М фосфорной кислоты. Затем колонку регенерируют, используя 100 мМ Трис и 1,8 М NaCl. После регенерации колонку уравнивают, используя уравнивающий буфер для аффинной очистки, который содержит около 1,2 мМ лимонной кислоты, 20 мМ фосфата, 360 мМ NaCl, 0,5 % сахарозы, 0,2 % F-68. Лизат клеток загружают в колонку после уравнивания, и после загрузки колонку снова уравнивают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Промывание с высоким содержанием соли проводят с использованием промывочного буфера, который содержит около 1,2 мМ лимонной кислоты, 20 мМ фосфата, 1200 мМ NaCl, 0,5% сахарозы, 0,2% F-68. После промывания с высоким содержанием соли колонку перед элюированием уравнивают уравнивающим буфером для аффинной очистки. Элюирующий буфер для аффинной хроматографии содержит 20 мМ лимонной кислоты, 360 мМ NaCl, 0,5% сахарозы, 0,2 % F-68 при pH 2,2. Сбор элюированного gAAV начинается на пике элюирования около более 50 мАЕ при A280. После элюирования колонку обрабатывают кислотой и регенерируют. Для очистки колонки используют 4 М гидрохлорида гуанидина при линейной скорости потока около 75

см/ч. Затем колонку промывают водой для инъекций и буфером для хранения, который содержит 1,2 мМ лимонной кислоты, 20 мМ фосфата, 20% этанола при линейной скорости потока 75 см/ч. Буферы и образец, описанные выше, загружают в колонку с линейной скоростью потока около 120 см/ч, если не указано иное. Затем элюированную фракцию нейтрализуют с использованием фосфатного буфера, который содержит 0,4 М фосфата при рН 9,0. Целевой рН элюированной фракции после нейтрализации составляет 7,5.

**[0254]** При подготовке к анионообменной хроматографии образец из нейтральной элюированной фракции после аффинной хроматографии фильтруют с использованием фильтра Kleenpak, разводят и уравнивают с использованием уравнивающего буфера для анионообменной хроматографии, который содержит 18 мМ бис-трис-пропана, 0,0015 % F-68 при рН 9 и проводимости менее 2 мСм/см. Плотность загрузки колонки составляла от около  $1,0 \times 10^{13}$  до  $4,0 \times 10^{13}$  вг/мл. Перед разведением элюированной фракции колонку для анионообменной хроматографии подготавливают, выполняя следующие стадии: (i) промывают водой для инъекций, (ii) дезинфицируют буфером, содержащим 1 М NaOH и 1,2 М NaCl, (iii) снова промывают водой для инъекций, (iv) промывают элюирующим буфером для анионообменной хроматографии, который содержит 18 мМ бис-триспропана, 1,2 М NaCl, 0,0015 % F-68, и (v) уравнивают буфером для уравнивания анионообменной хроматографии, который содержит 18 мМ бис-триспропана, 0,0015 % F-68. Как только анионообменная хроматографическая колонка уравновешена, образец загружали в колонку с загрузочным рН около 9 и загрузочной проводимостью 2,3 мСм/см. После загрузки колонку снова промывают уравнивающим буфером для анионообменной хроматографии. Образец элюируют сначала уравнивающим буфером для анионообменной хроматографии, а затем элюирующим буфером для анионообменной хроматографии. Сбор фракции, содержащей гAAV, начинается на пике элюирования около более 5 мАЕ при A280 и заканчивается на пике элюирования около менее 15 мАЕ. Затем, элюированную фракцию после анионообменной хроматографии нейтрализуют, используя буфер для нейтрализации CIM QA, который содержит 0,6 М Трис/HCL при рН около 6,2. Буферы и образцы во время анионообменной хроматографии загружают в колонку при объемной скорости потока 1,5 л/мин, если не указано иное.

**[0255]** После нейтрализации образец концентрируют с помощью TFF и ультрафильтрации/диафильтрации с плотностью загрузки около  $1,8 \times 10^{17}$  вг/м<sup>2</sup> вирусных частиц. Буфер, используемый при фильтрации, содержит Трис, MgCl<sub>2</sub>, NaCl и полоксамер 188.

**[0256]** Отфильтрованный образец содержит очищенные частицы гAAV и хранится в

хранилище BDS при температуре -80 °С. Исходный BDS содержит частицы гAAV с концентрацией около 1.5E+13 вг/мл и может быть разведен до концентрации DP более 1,0E+13 вг/мл. Образцы проходят стерилизующую фильтрацию перед упаковкой.

**Пример 11: Количественный ПЦР-анализ для измерения физического титра гAAV, кодирующего глюкоцереброзидазу.**

[0257] Целью этого анализа является количественная оценка физического титра инкапсулированного вектора AAV(например, AAV9) , кодирующего GCазу, с использованием количественной ПЦР (кПЦР) по сравнению с известным стандартом. Этот метод исследования можно использовать для количественного определения физического титра генома вектора в очищенных образцах вируса AAV или во фракциях процесса производства.

**Метод лабораторных испытаний**

**Таблица 1: Материалы**

Описание материала	Производитель	Номер продукта
Супермикс PerfeCTa для кПЦР с ROX	QuantaBio	95051-500
Сверхчистая дистиллированная вода (DIW)	Invitrogen	10977-023 или эквивалентный
96-луночный реакционный планшет MicroAmp optical	Applied Biosystems	43-067-37
Резервуары с раствором OctaPool™, 25 мл одноразовые, стерильные	Thomas Scientific	1159X93 или эквивалентный
DNA Away	Fisher Scientific	M0303L или эквивалентный
Стрипы и колпачки на 8 пробирок для ПЦР	VWR	2017-004
Микроцентрифужные пробирки Eppendorf DNA LoBind 1,5 мл	Eppendorf	02243 1021
Твин-80 (полисорбат-80)	VWR	JT4117-02
Протеиназа К, 20 мг/мл	Promega	MC5005
20% раствор ДСН	Fisher Scientific	BP1311-1 или эквивалентный
0,5 М ЭДТА pH 8,0	Fisher Scientific	BP2482 или

		эквивалентный
Буфер TE, pH 8,0	Fisher Scientific	AM9849 или эквивалентный
Коническая пробирка Falcon 15 мл	Fisher Scientific	14 959 53A или эквивалентный
Коническая пробирка Falcon 50 мл	Fisher Scientific	14 432 22 или эквивалентный
ДНКаза I (без РНКазы)	New England BioLabs	M0303S
Лямбда-ДНК, расщепленная Hind III	New England BioLabs	B7025

**Таблица 2: Оборудование**

Описание оборудования	Производитель	Номер продукта
QuantStudio™ 7 Flex	Applied Biosystems	4485695
Набор пипеток LTS Pipet-Lite XLS+ инструкция (P2,P20,P200,P1000)	Rainin	30386597
Комбинированные рабочие станции ПЦР	Системы AirClean™	AC632LFUVC
Центрифуга Sorvall ST8R	Fisher Scientific	75 230 395
Мини центрифуга Myspin 6	Fisher Scientific	75 004 061 или эквивалентный
Мини-вихревой смеситель	Fisher Scientific	400815B или эквивалентный
Термоциклер для ПЦР Simpliamp	Thermo Fisher	A24811 или эквивалентный

[0258] Линеаризованную плазмиду, кодирующую GCase, линеаризовали с помощью DraIII. Эталонным стандартом вируса был другой вектор gAAV, кодирующий GCазу.

**Таблица 3: Праймеры**

Праймер или зонд	Название	Последовательность
Прямой	Cov PR001-1_F	GAC TGT GGG ATC CGT TCG AA (SEQ ID NO: 6)

праймер		
Обратный праймер	Cov PR001-1_R	GAT TGA CAC CCG GCT CAG A (SEQ ID NO: 7)
Зонд TaqMan	Зонд Cov PR001-2	6FAM-CCA TGG AAT TCA GCA GCC CCA GC (SEQ ID NO: 8)-TAMRA

Примечание: предполагается, что все праймеры поставляются поставщиком в концентрации 100 мкМ и имеют чистоту уровня ВЭЖХ или выше.

**[0259] Предпосылка/теория метода:** Чтобы определить количество копий AAV, инкапсулирующих целевую последовательность, желаемую последовательность амплифицировали с помощью ПЦР с использованием кПЦР в реальном времени. В этом методе флуоресцентная репортерная молекула (такая как меченый красителем зонд) использовалась для наблюдения за ходом реакции амплификации. С каждым циклом амплификации увеличение интенсивности флуоресценции пропорционально увеличению концентрации ампликона, при этом приборная система кПЦР собирает данные для каждого образца во время каждого цикла ПЦР. Затем полученные графики зависимости флуоресценции от числа циклов для всех образцов устанавливали с их фоновой флуоресценцией в общей начальной точке. Номер цикла, при котором график амплификации пересекает заданный фоновый пороговый уровень флуоресценции, называется «Ct» или пороговым циклом. Путем сравнения значений Ct неизвестных образцов с известным стандартом, разведенным в различных концентрациях, были определены начальные концентрации неизвестных образцов, что позволило получить желаемое количество копий (если они присутствовали) в данном образце.

#### **[0260] Процедура**

**[0261]** Готовили 10% полисорбат-80, буфер для разведения для ПЦР, 10X буфер для протеиназы К и стандартный разбавитель. При необходимости линейаризованную плазмиду разводили до  $2 \times 10^9$  копий/мкл. 10-кратные серийные разведения были выполнены в стандартном разбавителе с использованием первого стандарта для получения стандартной кривой в диапазоне от  $2 \times 10^7$  копий/мкл до 20 копий/мкл. Набор стандартов (от  $2 \times 10^7$  до 20 копий/мкл) аликвотировали в 7 из 8 пробирок стрипа для ПЦР объемом 0,2 мл таким образом, чтобы каждый стрип служил одноразовой стандартной кривой. Исходный праймер готовили из лиофилизированного праймера.

**[0262]** Готовили растворы сравнения и контроль ДНКазы. Готовили эталонные стандарты и образцы. Все образцы и эталонные стандарты анализировали в трех повторностях. Разведение образцов для всех типов образцов были выбраны на основе исходной

концентрации на основе Таблицы 4. Образцы в процессе могут анализировать при максимальном разведении, предложенном для приведенной ниже теоретической концентрации образца.

**Таблица 4: Процедура разведения образца и эталонного стандарта**

Теоретическая концентрация образца (копий/мл)	Способ	Разведения для приготовления
$<1 \times 10^{12}$	кПЦР	1:10 и 1:100
$\geq 1 \times 10^{12}$	кПЦР	1:100 и 1:1000
Неизвестно	кПЦР	1:10, 1:100 и 1:1000

[0263] Готовили мастер-микс ДНКазы и мастер-микс протеиназы К. Образцы обрабатывали ДНКазой и смешивали с раствором протеиназы К.

[0264] Реакционная мастер-микс для кПЦР была приготовлена, как указано в Таблице 5:

**Таблица 5: Приготовление реакционной мастер-микс для кПЦР**

Компонент	Исходная концентрация (мкМ)	Конечная концентрация (мкМ)	Объем исходного на реакцию (мкл)
Мастер-микс для кПЦР	Н/Д	Н/Д	10
Прямой праймер	10	0,5	1
Обратный праймер	10	0,5	1
Зонд	5	0,25	1
Матрица или образец	Переменная		5
DIW	Н/Д	Н/Д	2,0
			20 мкл (общий)

[0265] кПЦР запускали с использованием следующих настроек с максимальной скоростью изменения:

**Таблица 6: Условия кПЦР**

Стадия	Температура	Время (мин:сек)	Циклы

1	95°C	5:00	1
2	95°C	0:15	45
	60°C	1:00	
3	4°C	Выдерживание	1

**[0266]** Конечное количество копии определяли следующим образом:

- a. Регистрировали амплификацию целевого ампликона на основе флуоресценции всех образцов в планшете для анализа, и значение  $C_t$  определяли автоматически с помощью программного обеспечения QuantStudio™.
- b. Стандартную кривую готовили путем построения графика зависимости  $C_t$  каждого стандарта от числа копий на реакцию в логарифмическом масштабе (конечный график представляет собой полулогарифмический график, при этом ось Y является линейной, а ось X имеет шкалу  $\log_{10}$ ). Это соответствовало прямой линии.
- c. Количество копий вектора в каждой реакционной лунке определяли путем интерполяции значений  $C_t$  со стандартной кривой, определенной в (b), и их нужно было включить в данные, экспортированные из прибора.
- d. Наконец, количество, определенное в (c) выше, умножали на коэффициенты разведения, использованные для приготовления образцов, чтобы получить конечное количество копий. Если для образца использовали 2 или более разведений, все действительные значения на стандартной кривой усредняли после расчетов.

**[0267]** Если значение  $C_t$  находится выше линейного диапазона стандартной кривой для кПЦР, образцы могут быть повторно приготовлены с использованием разведения, которое теоретически позволит ответу попасть в линейный диапазон.

**[0268]** Пригодность системы анализа считается приемлемой, если:

Параметр кПЦР	Критерий приемлемости
Линейность, наклон и пересечение	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Целевое значение <math>R^2</math> (линейность) калибровочной кривой должно быть <math>\geq 0,96</math>.</li> <li>- Целевой наклон калибровочной кривой должен быть в пределах от -3,1 до -3,6, что указывает на эффективность кПЦР от 90% до</li> </ul>

	110%.
Амплификация в контроле	- Образцы раствора сравнения должны иметь значения амплификации $Ct \geq 35$ или быть «неопределенными». - Образцы положительного контроля ДНКазы должны иметь эффективность ДНКазы $\geq 95\%$ стандарта линейаризованной плазмиды.

### **Протокол квалификации метода испытаний**

[0269] **Цель:** Целью этого плана квалификации является определение метода испытания физического титра инкапсулированного продукта AAV PR001. Этот протокол продемонстрирует, что метод дает надежные данные и подходит для анализа очищенных образцов AAV для целей исследования и разработки процессов (не GXP). Метод испытания указан выше.

**Таблица 7: Материалы для квалификации**

Описание материала	Ожидаемая концентрация
стандарт линейаризованной плазмиды	
партия tox	$2,67 \times 10^{11}$ вг/мл
эталонный стандарт	$6,25 \times 10^{13}$ вг/мл
Банк исследуемых вирусов	$1,83e^{13}$

[0270] Контроли точности и специфичности готовили, как описано выше, с заменой ДНКазы на DIW.

**Таблица 8: Критерии приемлемости квалификации метода**

	Элементы	Критерий приемлемости
Линейность	- Калибровочную кривую стандарта линейаризованной плазмиды выполняют как минимум на 6 различных уровнях в соответствии с описанным выше методом испытания.	- Целевое значение $R^2$ (линейность) калибровочной кривой должно быть $\geq 0,96$ . Целевой наклон калибровочной кривой должен быть в пределах от -3,1 до -3,6, что указывает на эффективность кПЦР от 90% до 110%.

	Будет выполнено не менее 6 различных стандартных кривых.	
Специфичность	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Обеспечение специфичности трансгена</li> <li>- Обеспечение удаления неинкапсулированной ДНК</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Значения <math>St \geq 35</math> или «Не определено» другого трансгена в аналогичном или идентичном осто́ве вектора</li> <li>- Эффективность ДНКазы <math>\geq 95\%</math> стандарта линеаризованной плазмиды</li> </ul>
Внутрианалитическая сходимость	<p>Эталонный стандарт банка вирусов и банк исследуемых вирусов готовят как минимум в 2 независимых разведениях (см. метод испытания выше), при этом каждый образец анализируют в трех повторностях, чтобы можно было провести анализ не менее 6 повторностей двумя независимыми операторами (всего 12 повторностей за выполнение).</p>	<p><math>\%CV \leq 15</math> от средней концентрации при каждом выполнении квалификационных прогонов.</p>
Межаналитическая сходимость	<p>Выполняют внутрианалитическую процедуру в течение нескольких дней, чтобы включить как минимум 3 независимых выполнения двумя аналитиками эталонного стандартного банка вирусов и банка исследуемых вирусов.</p>	<p><math>\%CV \leq 15</math> от средней концентрации по квалификационным прогонам.</p>
Линейность и точность разведения	<p>стандарт линеаризованной плазмиды в 2х известных концентрациях (см. метод</p>	<p>Извлечение <math>\pm 25\%</math> в пределах номинальной известной концентрации плазмиды.</p>

испытания выше) будет приготовлен как минимум в 3 отдельных исполнениях, при этом каждый образец анализируют в трех повторностях.	
--	--

[0271] Схема планшета / настройки исполнения

**Таблица 9: Схема кПЦР (выполнение 1)**

	1	2	3	4	5	6	7
A	2,00E+07 станд.			2E9 плазмид 1:1000 + ДНКказа	2e9 плазмид 1:100		
B	2,00E+06 станд.			2E9 плазмид 1:1000 + ДНКказа	2e9 плазмид 1:1 000		
C	2,00E+05 станд.			2E9 плазмид 1:1000 + ДНКказа	J00142 (1:30) 1:100		
D	2,00E+04 станд.			вода	J00142 (1:30) 1:1 000		
E	2,00E+03 станд.			вода	J00171 1:100		
F	2,00E+02 станд.			PR006 1:1000 контр. специф.	J00171 1:1 000		
G	2,00E+01 станд.			PR006 1:1000 контр. специф.	J00059 1:100		
H	Вода			PR006 1:1000 контр. специф.	J00059 1:1 000		

**Таблица 10: Схема кПЦР (выполнения 2 и 3)**

	1	2	3	4	5	6	7
A	2,00E+07 станд.			2E9 плазмид 1:1000 + ДНКказа	2e9 плазмид 1:100		
B	2,00E+06 станд.			2E9 плазмид 1:1000 + ДНКказа	2e9 плазмид 1:1 000		
C	2,00E+05 станд.			2E9 плазмид 1:1000 + ДНКказа	J00142 (1:30) 1:100		
D	2,00E+04 станд.			вода	J00142 (1:30) 1:1 000		
E	2,00E+03 станд.			вода	J00171 1:100		
F	2,00E+02 станд.			вода	J00171 1:1 000		
G	2,00E+01 станд.			вода	J00059 1:100		
H	Вода			вода	J00059 1:1 000		

[0272] Обработка данных и отчетность: Необработанные данные будут получены QuantStudio™ 7 для автоматического расчета количества копий/реакций, как описано выше

в методе испытания. 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 рассмотрены вторым аналитиком. [0273] На основании результатов всех действительных циклов анализа и всех допустимых концентраций эталонного стандартного вируса и исследуемого вируса общий средний титр по всем циклам из квалификации будет использован для установления номинального значения титра для этих образцов для использования в дальнейшем анализе.

**Пример 12: Анализ ферментативной активности *in vitro* для rAAV, кодирующего GCазу.**

[0274] Целью данного анализа является измерение *in vitro* относительной активности инкапсулированного вектора AAV (*например*, AAV9), кодирующего GCазу, с использованием анализа на основе клеток.

**Метод лабораторных испытаний**

[0275] Целью этого метода является измерение реакции на дозу инкапсулированного AAV вектора, кодирующего GCазу, *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 11: Определения**

AAV9	Аденоассоциированный вирус серотипа-9
CV	Коэффициент вариации
Экципиент	Буфер для состава
ФБС	Фетальная бычья сыворотка
FB	Буфер для состава; то же, что экципиент
GCаза	Глюкоцереброзаза, также известная как $\beta$ -глюкоцереброзаза
Glc	Глюкоза или глюкoпиранозид
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 12: 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
Буфер для анализа: 50 мМ лимонной кислоты, 176 мМ K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 10 мМ таурохолата натрия и 0,01% Твин-20 при рН 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

дном		
Считыватель Varioskan Lux	Thermo Fisher Scientific	FA-0049
Стерильные микроцентрифужные пробирки Biorpur 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- $\beta$ -D-глюкопиранозид	Marker Gene Technologies	M0569
Диметилсульфоксид (ДМСО)	Sigma-Aldrich	D2438-50ML

[0276] Предпосылки/Теория метода: PR001 представляет собой типичный гAAV, экспрессирующий GBA1. Анализ трансдукции вводит PR001 в клетки HEK293T и приводит к экспрессии фермента GCазы. Ферментативную активность, полученную в результате трансдукции, анализировали в лизате клеток с использованием флуорогенного субстрата 4-метилумбеллиферил- $\beta$ -D-глюкопиранозид, который генерирует флуоресцентный продукт резорурфин под действием катализа GCазы. Относительную активность между двумя или более гAAV рассчитывали по ферментативной активности, полученной в результате трансдукции различных количеств PR001, с использованием параллельного линейного анализа.

**Таблица 13: Реагенты/Разбавитель/Среда**

<b>Продукт</b>
10% ФБС/ДМЕМ/Пен/Стреп
<b>[Среда для культивирования клеток]</b>
2% ФБС/ДМЕМ
10 % ФБС/ДМЕМ/ 1 мкМ Hoechst 33342
<b>[Среда для восстановления]</b>
50 мМ цитрата - 176 мМ фосфатного буфера для анализа, pH 5,9
2 мкМ Hoechst 33342 в 2% ФБС/ДМЕМ [среда для трансдукции]
Буфер для анализа лизиса с мини-таблеткой коктейля ингибитора протеазы
Резорурфин- $\beta$ -D-глюкопиранозид [исходный]

[0277] Процедура: Клетки НЕК293Т высевали по 20 000 клеток/лунку в 96-луночный планшет и оставляли прикрепляться в течение ночи при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Серийные разведения AAV готовили в его эксципиенте, как показано в Таблице 14.

**Таблица 14**

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

[0278] 10 мкл разведений AAV или носителя переносили в лунки в соответствии с картой планшета на Фиг. 1. Результирующие общие вг были достигнуты (Таблица 15).

**Таблица 15**

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

[0279] Клетки инкубировали от 2 до 2,5 часов в инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. 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% CO<sub>2</sub>, чтобы обеспечить экспрессию GСазы вирусного происхождения.

[0280] Собирали клеточные лизаты. Активность GСазы измеряли путем добавления 10 мкл 1,25 мМ рабочего раствора резорифин-β-D глюкопиранозида в черный планшет с

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

[0281] Анализ: Параллельный анализ данных для расчета относительной активности проводили следующим образом:

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 GCазы (ОЕФ/ч).
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:  
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 16: 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 <sup>2</sup>	Целевое значение R <sup>2</sup> линейной регрессии на стадии 3 анализа для RS должно быть > 0,9.
Эталонный стандарт и повторности исследуемого образца	% CV $\leq 30$ . Одна повторность может быть замаскирована для достижения % CV $\leq 30$ .

#### **Протокол квалификации метода испытаний**

[0282] 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).

**Таблица 17: Материалы для квалификации**

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

**[0283]** 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 18 приведены процедуры валидации и критерии приемлемости, которые будут использоваться для оценки эффективности метода.

**Таблица 18: Краткое изложение процедуры валидации и критериев приемлемости квалификации**

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

	(количеству) анализируемого вещества в образцах.	Средняя (измеренная) относительная активность будет нанесена на график относительно ожидаемой относительной активности и проанализирована с использованием линейной регрессии.	
<b>Точность</b>	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.
<b>Повторяемость</b>	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 те же условия).	% RSD будет ≤ 30% на каждом уровне для каждого аналитика за каждую неделю.
<b>Промежуточная сходимость</b>	Сходимость (т. е. близость совпадения между сериями измерений, полученных при многократном взятии образцов одного	Данные о линейности будут оценивать для оценки промежуточной сходимости. Общий % RSD будут рассчитывать на каждом уровне.	Общий % RSD будет ≤ 30% на каждом уровне.

	того же однородного образца в заданных условиях), выражающая изменение в зависимости от разных недель и разных аналитиков.		
<b>Диапазон</b>	Интервал между верхней и нижней концентрацией, демонстрирующий подходящий уровень линейности, точности и сходимости.	Результаты линейности, точности и сходимости будут использоваться для определения диапазона метода.	Диапазон будет определен в исследовании. Концентрации образца в пределах диапазона должны соответствовать критериям приемлемости для линейности, точности и сходимости.
<b>Специфичность</b>	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.

**[0284] Линейность:** Исследуемые образцы AAV9-GVA 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.

[0285] Точность: Данные о линейности будут оценивать для оценки точности. Средний процент извлечения будет рассчитываться на каждом уровне по следующей формуле:

$$\% \text{ извлечения} = \left( \frac{\text{сред. измер. знач.}}{\text{теорет. значение}} \right) \times 100\%$$

Будут представлены значения % восстановления на каждом уровне.

[0286] 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.

[0287] Промежуточная сходимост: Данные о линейности будут оценивать для оценки повторяемости. Общий % RSD будут рассчитывать на каждом уровне и сообщать.

[0288] 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.

[0289] 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.

[0290] 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 сходимост). Все полученные данные, включая детали экспериментов, такие как материалы, реагенты, используемое оборудование и условия испытаний, будут записаны и рассмотрены вторым аналитиком.

[0291] 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.

[0292] Пример данных анализа активности нескольких образцов PR001 показан на Фиг. 2.

### **Пример 13: Количественный анализ ПЦР для измерения титра гAAV, кодирующего програнулин.**

[0293] Целью этого анализа является количественная оценка физического титра

инкапсулированного вектора AAV (*например*, AAV9), кодирующего PGRN, с использованием количественной ПЦР (кПЦР) путем сравнения с известным стандартом или с помощью кцПЦР в отсутствие стандартов. Этот метод исследования можно использовать для количественного определения физического титра генома вектора в очищенных образцах вируса AAV или во фракциях процесса производства.

### **Метод лабораторных испытаний**

**Таблица 19: Материалы**

<b>Описание материала</b>	<b>Производитель</b>	<b>Номер продукта</b>
Супермикс PerfeCTa для кПЦР с ROX	QuantaBio	95051-500
супермикс кцПЦР для зондов (без dUTP)	BioRad	1863027
Сверхчистая дистиллированная вода (DIW)	Invitrogen	10977-023 или эквивалентный
96-луночный реакционный планшет MicroAmp optical	Applied Biosystems	43-067-37
Оптическая клейкая пленка MicroAmp	Applied Biosystems	43-119-71
Фольга для термосварки	BioRad	1814040
Наконечники для пипеток для автоматического генератора капель	BioRad	1864120
Картриджи для автоматического генератора капель DG32	BioRad	1864108
96-луночные планшеты для кцПЦР (с полуюбкой)	BioRad	12001925
Масло для автоматического создания капель для зондов	BioRad	1864110
Резервуары с раствором OctaPool™, 25 мл одноразовые, стерильные	Thomas Scientific	1159X93 или эквивалентный
DNA Away	Fisher Scientific	M0303L или эквивалентный

Стрипы и колпачки на 8 пробирок для ПЦР	VWR	2017-004
Микроцентрифужные пробирки Eppendorf DNA LoBind 1,5 мл	Eppendorf	022431021
Твин-80 (полисорбат-80)	VWR	JT4117-02
Протеиназа К, 20 мг/мл	Promega	MC5005
20% раствор ДСН	Fisher Scientific	BP1311-1 или эквивалентный
0,5 М ЭДТА pH 8,0	Fisher Scientific	BP2482 или эквивалентный
Буфер TE, pH 8,0	Fisher Scientific	AM9849 или эквивалентный
Коническая пробирка Falcon 15 мл	Fisher Scientific	14 959 53A или эквивалентный
Коническая пробирка Falcon 50 мл	Fisher Scientific	14 432 22 или эквивалентный
ДНКаза I (без РНКазы)	New England BioLabs	M0303S
Лямбда-ДНК, расщепленная Hind III	New England BioLabs	B7025

**Таблица 20: Оборудование**

Описание оборудования	Производитель	Номер продукта
QuantStudio™ 7 Flex	Applied Biosystems	4485695
Набор пипеток LTS Pipet-Lite XLS+ инструкция (P2,P20,P200,P1000)	Rainin	30386597
Комбинированные рабочие станции ПЦР	Системы AirClean™	AC632LFUVC
Центрифуга Sorvall ST8R	Fisher Scientific	75 230 395
Мини центрифуга Myspin 6	Fisher Scientific	75 004 061 или эквивалентный
Мини-вихревой смеситель	Fisher Scientific	400815B или эквивалентный
Термоциклер для ПЦР Simpliamp	Thermo Fisher	A24811 или эквивалентный
Уплотнитель пластин PX1	BioRad	181-4000

Автоматический генератор капель	BioRad	1864101
Считыватель капель QX200	BioRad	1864001 и 1864003
Термоциклер C1000 Touch	BioRad	10000068706

[0294] Линеаризованную плазмиду PR006A линеаризовали с помощью PmlI. Эталонным стандартом вируса была другая партия PR006.

**Таблица 21: Праймеры**

Праймер или зонд	Название	Последовательность
Прямой праймер	PR006-1_F	GTCTTCCACGACTGTGGGAT (SEQ ID NO: 9)
Обратный праймер	PR006-1_R	GTCAGGGCCACCCAGCTC (SEQ ID NO: 10)
Зонд TaqMan	PR006-1_Зонд	6FAM- CCGGTTGAGCCACCATGTGGACCC (SEQ ID NO: 11) -TAMRA

Примечание: предполагается, что все праймеры поставляются поставщиком в концентрации 100 мкМ и имеют чистоту уровня ВЭЖХ или выше.

[0295] Предпосылки/теория метода: Чтобы определить количество копий AAV, инкапсулирующих целевую последовательность, желаемую последовательность амплифицировали с помощью ПЦР с использованием одной или двух методологий. В первом методе используют кПЦР в реальном времени, в которой флуоресцентная репортерная молекула (например, меченый красителем зонд) используется для наблюдения за ходом реакции амплификации. С каждым циклом амплификации увеличение интенсивности флуоресценции пропорционально увеличению концентрации ампликона, при этом приборная система кПЦР собирает данные для каждого образца во время каждого цикла ПЦР. Затем полученные графики зависимости флуоресценции от числа циклов для всех образцов устанавливают с их фоновой флуоресценцией в общей начальной точке. Номер цикла, при котором график амплификации пересекает заданный фоновый пороговый уровень флуоресценции, называется «Ct» или пороговым циклом. Путем сравнения значений Ct неизвестных образцов с известным стандартом, разведенным в различных концентрациях, была определена начальная концентрация неизвестных образцов, что позволило получить желаемое количество копий (если они присутствовали) в данном образце. Второй метод использует кцПЦР, которая разделяет образец на отдельные капли. Затем капли амплифицируют с помощью ПЦР, и капли подсчитывают либо как положительные (содержащие флуоресценцию), либо как отрицательные (без

флуоресценции) на устройстве для считывания капель. Затем абсолютное количество копий определяют непосредственно из соотношения положительных капель к общему количеству с использованием распределения Пуассона и, следовательно, не требует стандартов.

**[0296] Процедура:**

**[0297]** Готовили 10% полисорбат-80, буфер для разведения для ПЦР, 10X буфер для протеиназы К и стандартный разбавитель. При необходимости линейаризованную плазмиду разводили до  $2 \times 10^9$  копий/мкл. 10-кратные серийные разведения были выполнены в стандартном разбавителе с использованием первого стандарта для получения стандартной кривой в диапазоне от  $2 \times 10^7$  копий/мкл до 20 копий/мкл. Набор стандартов (от  $2 \times 10^7$  до 20 копий/мкл) аликвотировали в 7 из 8 пробирок стрипа для ПЦР объемом 0,2 мл таким образом, чтобы каждый стрип служил одноразовой стандартной кривой. Исходный праймер готовили из лиофилизированного праймера.

**[0298]** Готовили растворы сравнения и контроль ДНКазы. Готовили эталонные стандарты и образцы. Все образцы и эталонные стандарты анализировали в трех повторностях. Разведения образцов для всех типов образцов были выбраны на основе исходной концентрации на основе Таблицы 22. **Таблица 22: Процедура разбавления образца и эталонного стандарта**

Теоретическая концентрация образца (копий/мл)	Способ	Разведения для приготовления
$<1 \times 10^{12}$	кПЦР	1:10 и 1:100
$<1 \times 10^{12}$	кцПЦР	1:100 и 1:1000
$\geq 1 \times 10^{12}$	кПЦР	1:100 и 1:1000
$\geq 1 \times 10^{12}$	кцПЦР	1:1000 и 1:10000
Неизвестно	кПЦР	1:10, 1:100 и 1:1000
Неизвестно	кцПЦР	1:100, 1:1000 и 1:10000

**[0299]** Мастер-микс для кПЦР была приготовлена, как указано в Таблице 23:

**Таблица 23: Приготовление реакционной мастер-микс для кПЦР**

Компонент	Исход. конц. (мкМ)	Конечная конц. (мкМ)	Объем исходного на реакцию (мкл)
Мастер-микс для	Н/Д	Н/Д	10

кПЦР			
Прямой праймер	10	0,5	1
Обратный праймер	10	0,5	1
Зонд	5	0,25	1
Матрица или образец	Переменная		5
DIW	Н/Д	Н/Д	2,0
			<b>20 мкл (общий)</b>

[0300] Для кцПЦР использовали следующую реакционную смесь, приготовленную аналогично Таблице 23:

**Таблица 24: Приготовление реакционной мастер-микс для кцПЦР**

Компонент	Исход. конц. (мкМ)	Конечная конц. (мкМ)	Объем исходного на реакцию (мкл)
Мастер-микс для кцПЦР	Н/Д	Н/Д	11
Прямой праймер	10	0,5	1,1
Обратный праймер	10	0,5	1,1
Зонд	5	0,25	1,1
Матрица или образец	Переменная		2,5
DIW	Н/Д	Н/Д	5,2
			<b>22 мкл (общий)</b>

[0301] кПЦР или кцПЦР проводили следующим образом. Для кПЦР 15 мкл реакционной мастер-микс добавляли во все лунки планшета для анализа, которые будут содержать образцы. Для кцПЦР 19,5 мкл реакционной мастер-микс добавляли во все лунки планшета для анализа, которые будут содержать образцы. Предварительно аликвоты стандартов добавляли в планшет по 5 мкл на лунку для кПЦР. Для кцПЦР эту стадию можно пропустить, поскольку стандартная кривая не используется. В соответствующие планшеты добавляли 5 мкл разведенных образцов, контролей или эталонных стандартов для кПЦР, 2,5 мкл разведенных образцов для кцПЦР. Контроль без матрицы также должен быть включен в каждый анализ, в котором образец заменяется водой.

[0302] кПЦР запускали с использованием следующих настроек с максимальной скоростью изменения:

**Таблица 25: Условия кПЦР**

Стадия	Температура	Время (мин:сек)	Циклы
1	95°C	5:00	1
2	95°C	0:15	45
	60°C	1:00	
3	4°C	Выдерживание	1

**[0303]** Конечное количество копии определяли следующим образом:

- a. Регистрировали амплификацию целевого ампликона на основе флуоресценции всех образцов в планшете для анализа, и значение  $C_t$  определяли автоматически с помощью программного обеспечения QuantStudio™.
- b. Стандартную кривую готовили путем построения графика зависимости  $C_t$  каждого стандарта от числа копий на реакцию в логарифмическом масштабе (конечный график представляет собой полулогарифмический график, при этом ось Y является линейной, а ось X имеет шкалу  $\log_{10}$ ). Это соответствовало прямой линии.
- c. Количество копий вектора в каждой реакционной лунке определяли путем интерполяции значений  $C_t$  со стандартной кривой, определенной в (b), и их следует включить в данные, экспортированные из прибора.
- d. Наконец, количество, определенное в (c) выше, умножали на коэффициенты разведения, использованные для приготовления образцов, чтобы получить конечное количество копий. Если для образца используют 2 или более разведений, все действительные значения на стандартной кривой усредняли после расчетов.

**[0304]** кцПЦР проводили следующим образом:

**Таблица 26: Условия кцПЦР**

Стадия	Температура	Время (мин:сек)	Циклы
1	95°C	10:00	1
2	94°C	0:30	39
	60°C	1:00	
3	98°C	10:00	1

4	12°C	Выдерживание	1
---	------	--------------	---

[0305] Конечное количество копий определяли автоматически программным обеспечением QuantSoft на основе количества положительных капель относительно общего количества капель с использованием распределения Пуассона. Если для образца использовали 2 или более разведений, все действительные значения на стандартной кривой будут усреднены после расчетов. Эти подсчеты должны быть включены в экспорт данных. Если значение  $C_t$  находится выше линейного диапазона стандартной кривой для кПЦР или определено как «No call» в кцПЦР, образцы могут быть повторно приготовлены с использованием разведения, которое теоретически позволит ответу попасть в линейный диапазон.

[0306] Пригодность системы анализа считается приемлемой, если:

Параметр кПЦР	Критерий приемлемости
Линейность, наклон и пересечение	Целевое значение $R^2$ (линейность) калибровочной кривой должно быть $\geq 0,96$ . Целевой наклон калибровочной кривой должен быть в пределах от -3,1 до -3,6, что указывает на эффективность кПЦР от 90% до 110%. Целевое пересечение калибровочной кривой должно быть между значением $C_t$ от 36 до 41.
Аmplификация отрицательном контроле	Все растворы сравнения и положительные контроли ДНКазы должны иметь значения амплификации $C_t \geq 35$ или быть «неопределенными».
Точность	Рассчитанные копии эталонного стандарта для средних концентраций в действительном диапазоне составляют $\pm 20\%$ от ожидаемой концентрации.

Параметр кцПЦР	Критерий приемлемости
Аmplификация отрицательном контроле	Все растворы сравнения и положительные контроли ДНКазы должны иметь концентрацию менее 5 копий/мкл.
Точность	Рассчитанные копии эталонного стандарта составляют $\pm 20\%$ от ожидаемой концентрации.

[0307] Пригодность образца считается приемлемой, если:

Параметр кцПЦР	Критерий приемлемости
Количество капель	Общее количество принятых капель должно быть $> 10000$ .

## Протокол квалификации метода испытаний

[0308] Цель: Целью этого плана квалификации является определение метода испытания физического титра инкапсулированного продукта AAV PR006. Этот протокол продемонстрирует, что метод дает надежные данные и подходит для анализа очищенных образцов AAV для целей исследования и разработки процессов (не GXP). Метод испытания указан выше.

**Таблица 27: Материалы для квалификации**

Описание материала
Стандарт линейризованной плазмиды PR006
Эталонный стандартный банка вирусов PR006
Банк исследуемых вирусов PR006
Контроль специфичности (продукт PR001)

[0309] Контроли точности и специфичности готовили, как описано выше, с заменой ДНКазы на DIW.

**[0310] Таблица 28: Критерии приемлемости квалификации метода**

	Элементы	Критерий приемлемости
Линейность	- Калибровочную кривую стандарта линейризованной плазмиды выполняют как минимум на 6 различных уровнях в соответствии с описанным выше методом испытания. Будет выполнено не менее 6 различных стандартных кривых.	- Целевое значение $R^2$ (линейность) калибровочной кривой должно быть $\geq 0,96$ . Целевой наклон калибровочной кривой должен быть в пределах от -3,1 до -3,6, что указывает на эффективность кПЦР от 90% до 110%.
Специфичность	- Обеспечение специфичности трансгена - Обеспечение удаление неинкапсулированной ДНК	- Значения $C_t \geq 35$ или «Не определено» другого трансгена в аналогичном или идентичном остовете вектора

		- Эффективность ДНКазы $\geq 95\%$ стандарта линеаризованной плазмиды
Внутрианалитическая сходимость	- Эталонный стандарт банка вирусов и банк исследуемых вирусов готовят как минимум в 2 независимых разведениях (см. метод испытания выше), при этом каждый образец анализируют в трех повторностях, чтобы можно было провести анализ не менее 6 повторностей двумя независимыми операторами (всего 12 повторностей за выполнение).	- Отчет о результатах в виде %CV от средней концентрации при каждом выполнении квалификационных прогонов.
Межаналитическая сходимость	- Выполняют внутрианалитическую процедуру в течение нескольких дней, чтобы включить как минимум 3 независимых выполнения двумя аналитиками эталонного стандартного банка вирусов и банка исследуемых вирусов.	- Отчет о результатах в виде %CV от средней концентрации по квалификационным прогонам.
Линейность и точность разведения	- Стандарт линеаризованной плазмиды в 3х известных концентрациях (см. метод испытания выше) будет приготовлен как минимум в 3 отдельных исполнениях, при этом каждый образец анализируют в трех повторностях, чтобы можно	- Отчет о результатах в виде %CV номинальной известной концентрации плазмиды.

	было провести анализ не менее 27 повторностей двумя независимыми операторами, что дает всего 54 повторности.	
--	--	--

[0311] Схема планшета / настройки исполнения

**Таблица 29: Схема кПЦР (выполнение 1)**

	1	2	3	4	5	6	7
A	2,00E+07 станд.			2E9 плазмид 1:1000 + ДНКза	2e9 плазмид 1:10		
B	2,00E+06 станд.			2E9 плазмид 1:1000 + ДНКза	2e9 плазмид 1:100		
C	2,00E+05 станд.			2E9 плазмид 1:1000 + ДНКза	2e9 плазмид 1:1000		
D	2,00E+04 станд.			вода	Исследуемый вирус 1:100		
E	2,00E+03 станд.			вода	Исследуемый вирус 1:1000		
F	2,00E+02 станд.			PR001 1:1000 контр. специф.	Исследуемый вирус 1:10000		
G	2,00E+01 станд.			PR001 1:1000 контр. специф.	Эталонный стандарт 1:100		
H	Вода			PR001 1:1000 контр. специф.	Эталонный стандарт 1:1000		

**Таблица 30: Схема кПЦР (выполнения 2 и 3)**

	1	2	3	4	5	6	7
A	2,00E+07 станд.			2E9 плазмид 1:1000 + ДНКза	2e9 плазмид 1:10		
B	2,00E+06 станд.			2E9 плазмид 1:1000 + ДНКза	2e9 плазмид 1:100		
C	2,00E+05 станд.			2E9 плазмид 1:1000 + ДНКза	2e9 плазмид 1:1000		
D	2,00E+04 станд.			вода	Исследуемая партия 1:100		
E	2,00E+03 станд.			вода	Исследуемая партия 1:1000		
F	2,00E+02 станд.			вода	Исследуемая партия 1:10000		
G	2,00E+01 станд.			вода	Эталонный стандарт 1:100		
H	Вода			вода	Эталонный стандарт 1:1000		

[0312] Обработка данных и отчетность

[0313] Необработанные данные будут получены QuantStudio™ 7 для автоматического расчета количества копий/реакций, как описано выше в методе испытания. Эти данные будут экспортированы в таблицу Excel для расчета дополнительных параметров анализа (например, точность и сходимости). Все полученные данные, включая детали экспериментов, такие как материалы, реагенты, используемое оборудование и условия

испытаний, будут записаны и рассмотрены вторым аналитиком.

**[0314]** На основании результатов всех действительных циклов анализа и всех допустимых концентраций эталонного стандартного вируса и исследуемого вируса будет использован общий средний титр по всем циклам из квалификации.

**Пример 14: Анализ ферментативной активности *in vitro* для rAAV, кодирующего програнулин.**

**[0315]** Этот анализ измеряет активность *in vitro* в отношении rAAV (*например*, AAV9), кодирующего PGRN. Анализ проводили в 96-луночном формате. Клетки HEK293 высевали в количестве 20 000 клеток на лунку и трансдуцировали на следующий день с помощью AAV9-GRN при различных концентрациях лекарственного средства как для исследуемого препарата, так и для эталонного стандарта. Через 72 часа после трансдукции уровни PGRN измеряли с помощью ИФА (AdipoGen Life Sciences кат. номер № AG-45A-0018YEK-KI01). Сообщаемое значение относительной активности по отношению к эталонному стандарту рассчитывали с использованием анализа параллельных линий. Пример данных анализа активности нескольких образцов PR006 (rAAV, содержащий капсид AAV9 и кодирующий PGRN) показан на Фиг. 3. В качестве альтернативы можно использовать 6 групп MOI для уменьшения изменчивости коэффициента наклона. Коэффициент разведения также можно изменить, чтобы охватить диапазон количества програнулина в образцах, тем самым сводя к минимуму количество повторов.

**Пример 15: Анализы для измерения чистоты белка и соотношения белков вирусного капсида в композициях rAAV**

**[0316]** Цель:Целью этого метода является оценка чистоты белка и соотношения вирусного белка в образцах rAAV с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН-ПААГ).

**[0317]** Объем и предпосылки: Этот метод тестирования можно использовать для полуколичественной оценки чистоты или соотношения бэндов очищенных образцов вируса rAAV или фракций технологического производства.

**[0318]** ДСН-ПААГ разделяет компоненты белковой смеси в условиях восстановления и денатурации на основе относительной молекулярной массы для оценки гомогенности образца. Рубиновый белковый гель-краситель SYPRO® — это сверхчувствительный люминесцентный краситель, который выявляет белки, разделенные с помощью ПААГ. Целью этого анализа является определение относительного количества капсидных белков AAV (VP 1, 2 и 3) и других бэндов примесей. Метод можно использовать для расчета

соотношения бэндов VP и/или процентной чистоты этих бэндов по отношению ко всем бендам примесей. Молекулярная масса всех белков в образце может быть определена относительно стандартного маркера молекулярной массы.

**[0319] Процедура:** Готовят фиксирующий буфер, промывочный буфер, рабочий буфер MES и смесь буферов для образцов. Готовят серийные разведения образцов гAAV. Образцы могут прогонять в трех повторностях. Образцы и стандартный маркер молекулярной массы загружают в гель, и гель прогоняют. Затем гель окрашивают красителем SYPRO® Ruby. Затем изображение окрашенного геля анализируют (система визуализации ChemiDoc™ MP, BioRad) для расчета соотношения бэндов VP и чистоты образца. Ожидаемые молекулярные массы VP1, VP2 и VP3 следующие: VP1 = 87 кДа, VP2 = 72 кДа, VP3 = 62 кДа.

**[0320]** Пригодность системы анализа считается приемлемой, если:

Параметр геля	Критерий приемлемости
Образцы в пределах динамического диапазона обнаружения	Если какой-либо из бэндов VP для данного образца выделен красным цветом более чем на 20%, когда выбран параметр «Выделить насыщенные пиксели». Другие образцы могут оставаться валидными, но конкретный образец, который не соответствует этому требованию, должен быть повторен.
Эффективно мигрирующий гель	Движущийся фронт или краситель на геле должен быть нижней частью геля

**[0321]** Две партии материала PR006 (AAV9-PGRN) продемонстрировали разницу в активности *in vitro*. Чтобы исследовать эту разницу, проводят ДСН-ПААГ, как описано выше, чтобы определить, значительно ли отличаются количество примесей и соотношения капсидных белков VP в этих партиях. Аналитическое ультрацентрифугирование также проводят для исследования соотношения полных и неполных частиц в этих партиях.

**[0322]** Целью этого исследования является сравнение двух партий гAAV с точки зрения чистоты продукта и полных и пустых частиц капсида, свойств продукта, которые могут влиять на активность продукта. Это будут оценивать двумя методами: первый будет анализировать соотношения вирусных белков и количество примесей по отношению к вирусным белкам с помощью ДСН-ПААГ. Второй использует аналитическое ультрацентрифугирование (AUC) для разделения и количественной оценки соотношения полных и неполных частиц. ДСН-ПААГ будут выполнять для обеих партий на одном и том же геле, чтобы можно было провести относительное сравнение исследуемого материала,

хранящегося при температуре  $\leq -60^{\circ}\text{C}$ .

**[0323]** Распределение образцов: перед исследованием один флакон G14C0519 будет разделен на аликвоты и задокументирован. Одну аликвоту объемом 100 мкл будут хранить при температуре  $< -60^{\circ}\text{C}$  для использования в одном цикле для SV-AUC, как подробно описано ниже. Отдельную аликвоту объемом 50 мкл будут хранить при температуре  $< -60^{\circ}\text{C}$  до проведения анализа с помощью ДСН-ПААГ, как описано выше.

**[0324]** Процедуры исследования: ДСН-ПААГ этих образцов будет проанализирован, как описано выше. В дополнение к загрузке образцов на основе общего количества вг, как указано в CoA для каждой партии, образцы также будут исследованы путем загрузки эквивалентного количества на основе общего белка с использованием концентрации белка с помощью микро-ВСА, как указано в CoA для каждой партии.

**[0325]** Будет проведено аналитическое ультрацентрифугирование. Вкратце, образцы сначала разводят буфером для образцов до OD 0,5 при 230 нм и анализируют в одной повторности. Образцы прогоняют с использованием следующих параметров:

**Таблица 33**

Стадия способа	Параметр	Настройки
Сбор данных XLI	Скорость ротора	12000 об/мин
	Скорость сканирования	90 сек/клетка
	Сканы	150-200
	Температура	20°C
	Длина волны	230 нм
SEDFIT-анализ	Диапазон S (мин-макс)	0-200 (или как оценено)
	Дно (см)	7,15
	Мениск (см)	Не устан.
	f/f0	Не устан.
	Доверительный интервал	0,68/0,95
	Vbar (мл/г) <sup>3</sup>	0,73
	$\rho$ (г/мл)	1,000
	$\eta$ (сП)	0,01002
	Шум RI	Не устан.
	Шум TI	Не устан.

**[0326]** Из полученных профилей SEDFIT c(s) и для оценки того, является ли пик

воспроизводимым или возможным артефактом моделирования («ложным» пиком) из-за подгонки модели, реализуется воспроизводимый пороговый критерий. Воспроизводимое пороговое значение определяют как процент поглощения для капсидных видов  $<0,5\%$  и/или  $<0,002$  OD, виды ниже этого критерия не включают в табличные результаты. Полная информация об анализе будет включена в отчет о биоанализе. Будет сообщено результирующее соотношение полных и неполных частиц (на основе процента от общего количества в соответствии с распределением  $c(s)$ ), определенное с помощью этого анализа.

**[0327]** Анализ данных и отчетность по данным: Все данные будут записаны и задокументированы. Для результатов ДСН-ПААГ % состава капсидного белка VP1 будет сравниваться между партиями. На основании литературы (см. Vosma *et al.* (2018) *Gene Therapy* 25:415–424 и ссылки в ней) такое соотношение белков VP является решающим фактором в контроле активности продукта. Для метода AUC более высокий % полных частиц по сравнению с пустыми и частично упакованными капсидами будет коррелировать с повышенной активностью.

## **ПРОНУМЕРОВАННЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ**

**[0328]** Несмотря на прилагаемую формулу изобретения, в данном изобретении представлены следующие пронумерованные варианты осуществления:

**[0329]** 1. Способ получения клеточного лизата, включающий:

- (i) получение биореактора, содержащего клетки насекомых, суспендированные в смеси, содержащей две или более среды для культивирования клеток насекомых, не содержащих сыворотки и/или белков;
- (ii) заражение клеток насекомых первой популяцией бакуловирусных векторов с множественностью заражения (MOI) около 1,0-2,0, где первая популяция бакуловирусных векторов содержит кассету экспрессии, кодирующую представляющий интерес генный продукт;
- (iii) заражение клеток насекомых одной или более дополнительными популяциями бакуловирусных векторов с множественностью заражения около 1,0-2,0, где каждая дополнительная популяция содержит кассету экспрессии, кодирующую белок Rep AAV и/или белок Cap AAV;
- (iv) культивирование инфицированных клеток насекомых в условиях, при которых инфицированные клетки насекомых продуцируют частицы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), кодирующие представляющий интерес ген; и
- (v) лизис инфицированных клеток насекомых с получением клеточного лизата,

содержащего частицы гAAV.

- [0330] 2. Способ по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что каждая из двух или более сред для культивирования насекомых, не содержащих сыворотки и/или белков, выбрана из среды 4Cell Insect CD, ESF-921, ESF-AF, среды ExpiSf CD, Express Five SFM, baculoGROW, IS SF и SF900 II SFM.
- [0331] 3. Способ по варианту осуществления 1 или 2, отличающийся тем, что смесь содержит от около 10% об./об. до около 50% об./об. среды SF900 II SFM.
- [0332] 4. Способ по любому из вариантов осуществления 1-3, отличающийся тем, что клетки насекомых на стадии (i) получают после 4-6 пассажей производственного штамма.
- [0333] 5. Способ по любому из вариантов осуществления 1-4, отличающийся тем, что заражение на стадии (ii) и заражение на стадии (iii) происходят одновременно.
- [0334] 6. Способ по любому из вариантов осуществления 1-5, отличающийся тем, что клетки насекомых присутствуют в биореакторе при плотности клеток от  $8E+06$  жизнеспособных клеток на мл (жк/мл) до около  $20E+06$  жк/мл.
- [0335] 7. Способ по любому из вариантов осуществления 1-6, отличающийся тем, что культивирование на стадии (iv) происходит в течение от 1 до 5 дней.
- [0336] 8. Способ по любому из вариантов осуществления 1-7, отличающийся тем, что лизис на стадии (v) включает приведение инфицированных клеток насекомых в контакт с детергентом.
- [0337] 9. Способ по любому из вариантов осуществления 1-8, дополнительно включающий стадию осветления клеточного лизата глубинной фильтрацией.
- [0338] 10. Способ по любому из вариантов осуществления 1-9, дополнительно включающий стадию концентрирования частиц гAAV в лизате тангенциальной проточной фильтрацией и/или диафильтрацией.
- [0339] 11. Способ по любому из вариантов осуществления 1-10, отличающийся тем, что представляющий интерес генный продукт включает пептид, полипептид, ингибирующую нуклеиновую кислоту или их комбинацию.
- [0340] 12. Способ по варианту осуществления 11, отличающийся тем, что представляющий интерес генный продукт включает глюкоцереброзидазу (GCазу), програнулин (PGRN), просапозин (PSAP), C9orf72, триггерный рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках 2 (TREM2), аполипопротеин E2 (ApoE2) или паркин.
- [0341] 13. Способ по любому из вариантов осуществления 1-12, отличающийся тем, что частицы гAAV содержат капсидный белок AAV, который представляет собой AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 или вариант любого из вышеперечисленных.

**[0342]** 14. Способ по любому из вариантов осуществления 1-13, отличающийся тем, что клеточный лизат содержит

(a) от около  $1E+11$  вирусных геномов на миллилитр (вг/мл) до около  $1,0E+13$  вг/мл;

(b) от около  $2E+11$  вирусных геномов на миллилитр (вг/мл) до около  $1,0E+13$  вг/мл; или

(c) от около  $5E+11$  вирусных геномов на миллилитр (вг/мл) до около  $1,0E+13$  вг/мл.

**[0343]** 15. Фармацевтическая композиция, содержащая клеточный лизат, полученный способом по любому из вариантов осуществления 1-14.

**[0344]** 16. Композиция по варианту осуществления 15, дополнительно содержащая криопротектор.

**[0345]** 17. Способ получения терапевтической композиции, включающий:

(i) получение клеточного лизата, содержащего частицы гAAV;

(ii) приведение в контакт колонки для аффинной хроматографии с клеточным лизатом, при этом аффинная колонка содержит связывающий агент, специфичный для капсидного белка частиц гAAV, в условиях, при которых частицы гAAV связываются с колонкой для аффинной хроматографии;

(iii) элюирование связанных частиц гAAV из колонки с получением таким образом первого элюата;

(iv) проведение анионообменной хроматографии первого элюата для получения второго элюата, при этом второй элюат содержит меньше пустых частиц гAAV, чем первый элюат;

(v) концентрирование второго элюата путем проведения тангенциальной проточной фильтрации с использованием проточного буфера, содержащего трис,  $MgCl_2$ , NaCl и полоксамер 188, с получением таким образом терапевтической композиции, содержащей частицы гAAV.

**[0346]** 18. Способ по варианту осуществления 17, отличающийся тем, что клеточный лизат на стадии (i) получают способом по любому из вариантов осуществления 1-14.

**[0347]** 19. Способ по варианту осуществления 17 или 18, отличающийся тем, что связывающий агент содержит аффинную смолу, специфичную в отношении капсидного белка AAV9.

**[0348]** 20. Способ по любому из вариантов осуществления 17-19, отличающийся тем, что анионообменная хроматография включает смешивание первого элюата с буфером для уравнивания с получением смеси, имеющей проводимость от около  $0,5$  мСм/см до  $5$  мСм/см, необязательно при этом смесь имеет проводимость  $2$  мСм/см, связывание смеси со смолой, содержащей четвертичный амин, для связывания частиц гAAV в смеси со смолой и элюирование частиц гAAV со смолы для получения второго элюата.

- [0349] 21. Способ по любому из вариантов осуществления 17-20, отличающийся тем, что второй элюат концентрируют до от около  $1,0E+12$  вг/мл до около  $1E+14$  вг/мл.
- [0350] 22. Способ по любому из вариантов осуществления 17-21, отличающийся тем, что терапевтическая композиция содержит от около  $1E+13$  вг/мл до около  $1E+14$  вг/мл.
- [0351] 23. Способ по любому из вариантов осуществления 17-22, отличающийся тем, что терапевтическая композиция содержит менее около 15% пустых частиц гAAV.
- [0352] 24. Терапевтическая композиция, содержащая частицы гAAV, при этом частица гAAV содержит капсидный белок AAV и кассету экспрессии, кодирующую представляющий интерес генный продукт, при этом терапевтическая композиция содержит более около  $1E+13$  вг/мл частиц гAAV, и при этом терапевтическая композиция содержит менее около 15% пустых частиц гAAV.
- [0353] 25. Терапевтическая композиция по варианту осуществления 24, отличающаяся тем, что представляющий интерес генный продукт включает пептид, полипептид, ингибирующую нуклеиновую кислоту или их комбинацию.
- [0354] 26. Терапевтическая композиция по варианту осуществления 25, отличающаяся тем, что представляющий интерес генный продукт включает GCазу, GRN, PSAP, TREM2, AроE2 или паркин.
- [0355] 27. Терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 24-26, отличающаяся тем, что частицы гAAV содержат капсидный белок AAV, который представляет собой AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 или вариант любого из вышеперечисленных.
- [0356] 28. Терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 24-27, отличающаяся тем, что терапевтическая композиция содержит от около  $1E+13$  вг/мл до около  $1E+14$  вг/мл.
- [0357] 29. Терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 24-28, отличающаяся тем, что терапевтическая композиция находится в контейнере.
- [0358] 30. Терапевтическая композиция по любому из пп. 24-29, отличающаяся тем, что терапевтическая композиция является стерильной.
- [0359] 31. Терапевтическая композиция по п. 30, отличающаяся тем, что терапевтическая композиция не способствует росту микроорганизмов.
- [0360] 32. Терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 24-31, отличающаяся тем, что терапевтическая композиция содержит эндотоксин в количестве менее около 0,5 ЕЭ/мл.
- [0361] 33. Терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 24-32, отличающаяся тем, что частица гAAV содержит капсидный белок AAV9.

- [0362] 34. Терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 24-33, отличающаяся тем, что более около  $1,0E+13$  вг/мл гAAV содержит генный продукт.
- [0363] 35. Терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 24-34, отличающаяся тем, что титр TCID<sub>50</sub> гAAV составляет от около 1000 вг/ИЕ до около 6000 вг/ИЕ.
- [0364] 36. Терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 24-35, отличающаяся тем, что генный продукт представляет собой GСазу.
- [0365] 37. Терапевтическая композиция по варианту осуществления 36, отличающаяся тем, что активность GСазы составляет по меньшей мере 110% относительно эталонного стандарта, при этом эталонный стандарт представляет собой очищенный гAAV, кодирующий GСАазу.
- [0366] 38. Терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 24-37, отличающаяся тем, что инфекционный титр составляет от около  $8,0E+9$  ИЕ/мл до около  $1,2E+10$  ИЕ/мл.
- [0367] 39. Терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 24-38, отличающаяся тем, что осмоляльность составляет от около 300 мОсм/кг до около 500 мОсм/кг.
- [0368] 40. Терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 24-39, отличающаяся тем, что рН составляет от около 7 до около 9.
- [0369] 41. Терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 24-40, отличающаяся тем, что терапевтическая композиция не содержит видимых частиц.
- [0370] 42. Терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 24-41, отличающаяся тем, что терапевтическая композиция содержит менее около 6000 частиц размером более около 10 мкм на контейнер и менее около 600 частиц размером более около 25 мкм на контейнер.
- [0371] 43. Терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 24-42, отличающаяся тем, что терапевтическая композиция содержит менее или около 3% агрегатов.
- [0372] 44. Терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 24-43, отличающаяся тем, что терапевтическая композиция содержит общий белок в количестве от около 300 мкг/мл до около 1000 мкг/мл.
- [0373] 45. Терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 24-44, отличающаяся тем, что чистота гAAV составляет более около 90% об./об.
- [0374] 46. Терапевтическая композиция по варианту осуществления 45, отличающаяся тем, что терапевтическая композиция не содержит какой-либо единичной примеси в

количестве больше около 5% об./об.

[0375] 47. Терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 24-46, отличающаяся тем, что терапевтическая композиция содержит от около 0,0007% до около 0,0012% плуроника.

[0376] 48. Терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 24-47, отличающаяся тем, что терапевтическая композиция содержит менее около  $5,5 \times 10^4$  копий РНК/мл рабдовируса.

[0377] 49. Терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 24-48, отличающаяся тем, что экстрагируемый объем терапевтической композиции в контейнере равен или больше около 1,0 мл.

**Таблица 34: Таблица последовательностей**

<p>Аминокисл отная последоват ельность GСазы</p>	<p>MEFSSPSREECPKPLSRV SIMAGSLTG LLLLQAVSWASGARPCIPK SFGYSSVVCNATYCDSFDPPTFPALGTFSTRYESTRSGRRMELS MGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAALNILAL SPPAQNLLLKSYFSEEGIGYNIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDDF QLHNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQLAQRPVSLASPWTSPTWLKT NGAVNGKGS LKGQPGDIYHQ TWARYFVKFLDAYAEHKLQFWA VTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQ RDFIARDLGPTLANSTHH NVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLDL LAPAKATLGETHRLFPNTMLFA SEACVGSKFWEQSVRLGSWDR GMQYSHSIITNLLYHVVGWTDWNLALNPEGGPNWVRNFVDSPII VDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRVGLVASQKNDLDAV ALMHPDGS AVVVVLNRSSKDVPLTIKDP AVGFLETISPGYSIHTY LWRRQ (SEQ ID NO: 1)</p>
<p>Кодон- оптимизир ованная нуклеотидн ая последоват ельность, кодирующая</p>	<p>atggaattcagcagccccagcagagaggaatgccccagcctctgagccgggtgcaatcatggccc gatctctgacaggactgctgctgctcaggccgtgcttgggcttctggcgctagaccttgcaccccaa gagcttcggctacagcagcgtcgtgctgcaatgccacactactgcgacagcttcgaccctctac ctttctgctctgggcaccttcagcagatacagagaccagatccggcagacggatggaactgagca tgggacctatccaggccaatcacacaggcactggcctgctgctgacactgcagcctgacagaaattc cagaaagtgaaggcttcggcggagccatgacagatgccgccgctctgaatctctggctctgtctcca ccagctcagaacctgctgctcaagagctactcagcgaggaaggcatcggtacaacatcatcagagt gccccatggccagctgcgacttcagcatcaggacctacacctacgccgacacacccgacgattccagc</p>

<p>я ГСазу</p>	<p>tgcaaacctcagcctgcctgaagaggacaccaagctgaagatccctctgatccacagagccctgcag  ctggcacaagaccctgtcactgctggcctctccatggacatctcccactggctgaaaacaaatggc  gccgtgaatggcaagggcagcctgaaaggccaacctggcgacatctaccaccagacctgggccaga  tactcgtgaagttcctggacgcctatgccgagcacaagctgcagtttggccgtgacagccgagaac  gaaccttctgctggactgctgagcggctaccctttcagtgctggcctttaccccagcaccagcgg  gactttatgccccgtgatctgggaccacactggccaatagcaccaccataatgtgcggctgctgatg  ctggacgaccagagactgcttctgccccactgggctaaagtgggtgctgacagatcctgaggccgcaa  atacgtgcacggaatgccgtgactggatctggactttctggcccctgccaaggccacactgggag  agacacacagactgttcccaacaccatgctgttcgccagcgaagcctgtgtggcagcaagtttggg  aacagagcgtgcccgtggcagctgggatagaggcatgcagtacagccacagcatcatccaacct  gctgtaccacgtcgtcggctggaccgactggaatctggccctgaatcctgaaggcggcctaactggg  tccgaaactcgtggacagccccatcatcgtggacatccaaggacaccttctacaagcagccatgt  tctaccactgggacacttcagaagttcatccccgagggctctcagcgcgttgactggtggttccc  agaagaacgatctggacgccgtgctctgatgcaccctgatggatctgctgtggtggtgctgaacc  gcagcagcaaagatgtcccctgaccatcaaggatcccgcctgggattcctggaacaatcagccct  ggctactccatccacacctacgtggcgtagacag</p> <p>(SEQ ID NO: 2)</p>
<p>Аминокисл отная последоват ельность програнули на</p>	<p>MWTLVSWVALTAGLVAGTRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCR  PLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE  AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNNNSVGAIQCPDSQFE  CPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVH  TRCITPTGTHPLAKKLPQR TNRAVALSSVMCPDARSRCPDGST  CCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKE  NATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDPGYTCCRLQSGAWGCC  PFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPA  HLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAV  CCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHP  RDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCP  AGYTCNVKARSCEKEVVS AQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHF  CHDNQTCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAAR  GTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQLL</p> <p>(SEQ ID NO: 3)</p>

Кодон- оптимизир ованная нуклеотидн ая последоват ельность, кодирующа я програнули н	atgtggaccctggtgagctgggtggcctgaccgccggcctggtggccggcaccgctgccccgac ggccagttctgccccgtggcctgctgctggacccccggcggcgccagctacagctgctgcccccc tgctggacaagtggcccaccaccctgagccgccactggggcgcccctgccaggtggacgcccact gcagcgccggccacagctgcatcttaccgtgagcggcaccagcagctgctgcccctccccgaggc cgtggcctgcgggcgacggccaccactgctgccccgcggcttccactgcagcgccgacggccgag ctgcttcagcgcagcggcaacaacagcgtggcgccatccagtgccccgacagccagttcgagtg ccccacttcagcacctgctgctgatggtggacggcagctggggctgctgccccatgccccaggcca gctgctgcgaggaccgctgactgctgccccacggcgccttctgcgacctggtgacacccgctg catcacccccaccggcaccacccccctggccaagaagctgcccgccagcgcaccaaccgcccgt ggccctgagcagcagcgtgatgccccgacgccgcagccgctgccccgacggcagcacctgctg cgagctgcccagcggcaagtacggctgctgccccatgccaacgccacctgctgcagcgaccacct gactgctgccccaggacaccgtgtgcgacctgatccagagcaagtgcctgagcaaggagaacgc caccaccgacctgctgaccaagctgcccgccacaccgtggggcgacgtgaaftgacatggaggt gagctgccccgacggctacacctgctgccgctgcagagcggcgctggggctgctgcccctcacc caggccgtgtgctgcgaggaccatccactgctgccccgcccggcttccactgcgacaccagaagg gcacctgcgagcagggccccaccaggtgcctggatggagaaggccccgccacctgagcctg ccccacccccaggccctgaagcgcgacgtgcctgcgacaacgtgagcagctgccccagcagcga cacctgctgccagctgaccagcggcgagtggggctgctgccccatccccgaggccgtgtgctgcagc gaccaccgactgctgccccagggtacacctgctggccgagggccagtgccagcgcggcag cgagatcgtggccggcctggagaagatgcccgcccgccgagcctgagccacccccgcgaca tcggctgcgaccagcacaccagctgccccgtgggccagacctgctgccccagcctggcggcagct gggctgctgccagctgccccacgcccgtgtgctgcgaggaccgccagcactgctgccccgcccggct acacctgcaacgtgaaggccccgacgtgcgagaaggaggtggtgagcggccagccccccacctcc tggcccgagccccacgtgggctgaaggacgtggagtgcggcgagggccacttctgccacgaca accagacctgctcccgacaaccgccagggtgggctgctgcccctaccgccagggcgtgtgct gcgccgaccgccactgctgccccgcccgttccgctgcgcccggcgccaccaagtgcctgc ggcgagggcccccgctgggacgccccctgcgcgacccccgcccctgcccagctgctg (SEQ ID NO: 4)
ИТР ААV2 дикого типа	aggaaccctagtgatggagttggcactccctctctgcgctcgtcactgaggccgggcga ccaaaggtgccccgacggggcttggccggcggcctcagtgagcagcagcgcgagagaga gggagtggccaa (SEQ ID NO: 5)
Нуклеотид ная	tggaagacttcgagatacactgt (SEQ ID NO: 12)

последовательность, кодирующая ингибирующую нуклеиновую кислоту, нацеленную на $\alpha$ - синуклеин	
--	--

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения клеточного лизата, включающий:
  - (i) получение биореактора, содержащего клетки насекомых, суспендированные в смеси, содержащей две или более среды для культивирования клеток насекомых, не содержащих сыворотки и/или белков;
  - (ii) заражение клеток насекомых первой популяцией бакуловирусных векторов с множественностью заражения (MOI) около 1,0-2,0, где первая популяция бакуловирусных векторов содержит кассету экспрессии, кодирующую представляющий интерес генный продукт;
  - (iii) заражение клеток насекомых одной или более дополнительными популяциями бакуловирусных векторов с множественностью заражения около 1,0 и 2,0, где каждая дополнительная популяция содержит кассету экспрессии, кодирующую белок Rep AAV и/или белок Cap AAV;
  - (iv) культивирование инфицированных клеток насекомых в условиях, при которых инфицированные клетки насекомых продуцируют частицы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), кодирующие представляющий интерес ген; и
  - (v) лизис инфицированных клеток насекомых с получением клеточного лизата, содержащего частицы rAAV.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что каждая из двух или более сред для культивирования насекомых, не содержащих сыворотки и/или белков, выбрана из среды 4Cell Insect CD, ESF-921, ESF-AF, среды ExpiSf CD, Express Five SFM, baculoGROW, IS SF и SF900 II SFM.
3. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что смесь содержит от около 10% об./об. до около 50% об./об. среды SF900 II SFM.
4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что клетки насекомых на стадии (i) получают после 4-6 пассажей производственного штамма.
5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что заражение на стадии (ii) и заражение на стадии (iii) происходят одновременно.
6. Способ по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что клетки насекомых

присутствуют в биореакторе при плотности клеток от  $8E+06$  жизнеспособных клеток на мл (жк/мл) до около  $20E+06$  жк/мл.

7. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что культивирование на стадии (iv) происходит в течение от 1 до 5 дней.

8. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что лизис на стадии (v) включает приведение инфицированных клеток насекомых в контакт с детергентом.

9. Способ по любому из пп. 1-8, дополнительно включающий стадию осветления клеточного лизата глубинной фильтрацией.

10. Способ по любому из пп. 1-9, дополнительно включающий стадию концентрирования частиц гAAV в лизате тангенциальной проточной фильтрацией и/или диафильтрацией.

11. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что представляющий интерес генный продукт включает пептид, полипептид, ингибирующую нуклеиновую кислоту или их комбинацию.

12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что представляющий интерес генный продукт включает глюкоцереброзидазу (GCазу), програнулин (PGRN), просапозин (PSAP), C9orf72, триггерный рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках 2 (TREM2), аполипопротеин E2 (ApoE2) или паркин.

13. Способ по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что частицы гAAV содержат капсидный белок AAV, который представляет собой AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 или вариант любого из вышеперечисленных.

14. Способ по любому из пп. 1-13, отличающийся тем, что клеточный лизат содержит  
(a) от около  $1E+11$  вирусных геномов на миллилитр (вг/мл) до около  $1,0E+13$  вг/мл;  
(b) от около  $2E+11$  вг/мл до около  $1,0E+13$  вг/мл; или  
(c) от около  $5E+11$  вг/мл до около  $1,0E+13$  вг/мл.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая клеточный лизат, полученный

способом по любому из пп. 1-14.

16. Фармацевтическая композиция по п. 15, дополнительно содержащая криопротектор.

17. Способ получения терапевтической композиции, включающий:

(i) получение клеточного лизата, содержащего частицы гAAV;

(ii) приведение в контакт колонки для аффинной хроматографии с клеточным лизатом, при этом аффинная колонка содержит связывающий агент, специфичный для капсидного белка частиц гAAV, в условиях, при которых частицы гAAV связываются с колонкой для аффинной хроматографии;

(iii) элюирование связанных частиц гAAV из колонки с получением таким образом первого элюата;

(iv) проведение анионообменной хроматографии первого элюата для получения второго элюата, при этом второй элюат содержит меньше пустых частиц гAAV, чем первый элюат;

(v) концентрирование второго элюата путем проведения тангенциальной проточной фильтрации с использованием проточного буфера, содержащего трис,  $MgCl_2$ , NaCl и полуксамер 188, с получением таким образом терапевтической композиции, содержащей частицы гAAV.

18. Способ по п. 17, отличающийся тем, что клеточный лизат на стадии (i) получают способом по любому из пп. 1-14.

19. Способ по п. 17 или 18, отличающийся тем, что связывающий агент содержит аффинную смолу, специфичную в отношении капсидного белка AAV9.

20. Способ по любому из пп. 17-19, отличающийся тем, что анионообменная хроматография включает смешивание первого элюата с буфером для уравнивания с получением смеси, имеющей проводимость от около 0,5 мСм/см до 5 мСм/см, необязательно при этом смесь имеет проводимость 2 мСм/см, связывание смеси со смолой, содержащей четвертичный амин, для связывания частиц гAAV в смеси со смолой и элюирование частиц гAAV со смолы для получения второго элюата.

21. Способ по любому из пп. 17-20, отличающийся тем, что второй элюат концентрируют до от около  $1,0E+12$  вг/мл до около  $1E+14$  вг/мл.

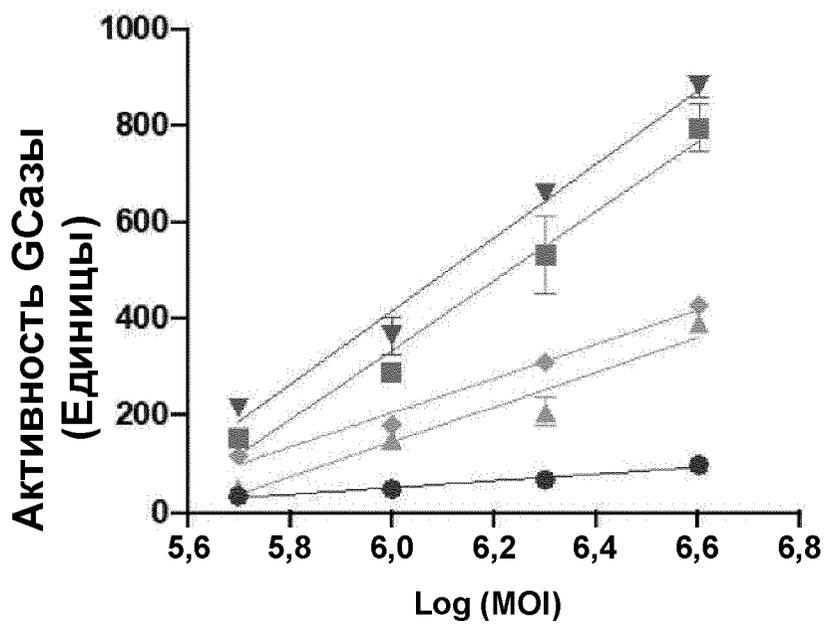
22. Способ по любому из пп. 17-21, отличающийся тем, что терапевтическая композиция содержит от около  $1E+13$  вг/мл до около  $1E+14$  вг/мл.
23. Способ по любому из пп. 17-22, отличающийся тем, что терапевтическая композиция содержит менее около 15% пустых частиц гAAV.
24. Терапевтическая композиция, содержащая частицы гAAV, при этом частица гAAV содержит капсидный белок AAV и кассету экспрессии, кодирующую представляющий интерес генный продукт, при этом терапевтическая композиция содержит более около  $1E+13$  вг/мл частиц гAAV, и при этом терапевтическая композиция содержит менее около 15% пустых частиц гAAV.
25. Терапевтическая композиция по п. 24, отличающаяся тем, что представляющий интерес генный продукт включает пептид, полипептид, ингибирующую нуклеиновую кислоту или их комбинацию.
26. Терапевтическая композиция по п. 25, отличающаяся тем, что представляющий интерес генный продукт включает GCазу, GRN, PSAP, TREM2, ApoE2 или паркин.
27. Терапевтическая композиция по любому из п. 24-26, отличающаяся тем, что частицы гAAV содержат капсидный белок AAV, который представляет собой AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 или вариант любого из вышеперечисленных.
28. Терапевтическая композиция по любому из п. 24-27, отличающаяся тем, что терапевтическая композиция содержит от около  $1E+13$  вг/мл до около  $1E+14$  вг/мл.
29. Терапевтическая композиция по любому из пп. 24-28, отличающаяся тем, что терапевтическая композиция находится в контейнере.
30. Терапевтическая композиция по любому из пп. 24-29, отличающаяся тем, что терапевтическая композиция является стерильной.
31. Терапевтическая композиция по п. 30, отличающаяся тем, что терапевтическая композиция не способствует росту микроорганизмов.

32. Терапевтическая композиция по любому из пп. 24-31, отличающаяся тем, что терапевтическая композиция содержит эндотоксин в количестве менее около 0,5 ЕЭ/мл.
33. Терапевтическая композиция по любому из пп. 24-32, отличающаяся тем, что частица гAAV содержит капсидный белок AAV9.
34. Терапевтическая композиция по любому из пп. 24-33, отличающаяся тем, что более чем около  $1,0E+13$  вг/мл гAAV содержит генный продукт.
35. Терапевтическая композиция по любому из пп. 24-34, отличающаяся тем, что титр TCID<sub>50</sub> гAAV составляет от около 1000 вг/ИЕ до около 6000 вг/ИЕ.
36. Терапевтическая композиция по любому из пп. 24-35, отличающаяся тем, что генный продукт представляет собой GСазу.
37. Терапевтическая композиция по п. 36, отличающаяся тем, что активность GСазы составляет по меньшей мере 110% относительно эталонного стандарта, при этом эталонный стандарт представляет собой очищенный гAAV, кодирующий GСАазу.
38. Терапевтическая композиция по любому из пп. 24-37, отличающаяся тем, что инфекционный титр составляет от около  $8,0E+9$  ИЕ/мл до около  $1,2E+10$  ИЕ/мл.
39. Терапевтическая композиция по любому из пп. 24-38, отличающаяся тем, что осмоляльность составляет от около 300 мОсм/кг до около 500 мОсм/кг.
40. Терапевтическая композиция по любому из пп. 24-39, отличающаяся тем, что рН составляет от около 7 до около 9.
41. Терапевтическая композиция по любому из пп. 24-40, отличающаяся тем, что не содержит видимых частиц.
42. Терапевтическая композиция по любому из пп. 24-41, отличающаяся тем, что содержит менее около 6000 частиц размером более около 10 мкм на контейнер и менее около 600 частиц размером более около 25 мкм на контейнер.

43. Терапевтическая композиция по любому из пп. 24-42, отличающаяся тем, что содержит менее или около 3% агрегатов.
44. Терапевтическая композиция по любому из пп. 24-43, отличающаяся тем, что содержит общий белок в количестве от около 300 мкг/мл до около 1000 мкг/мл.
45. Терапевтическая композиция по любому из пп. 24-44, отличающаяся тем, что чистота гAAV составляет более около 90% об./об.
46. Терапевтическая композиция по п. 45, отличающаяся тем, что не содержит какой-либо единичной примеси в количестве больше около 5% об./об.
47. Терапевтическая композиция по любому из пп. 24-46, отличающаяся тем, что содержит от около 0,0007% до около 0,0012% Pluronic.
48. Терапевтическая композиция по любому из пп. 24-47, отличающаяся тем, что содержит менее около  $5,5 \times 10^4$  копий РНК/мл рабдовируса.
49. Терапевтическая композиция по любому из пп. 24-48, отличающаяся тем, что экстрагируемый объем терапевтической композиции в контейнере равен или больше около 1,0 мл.

	Повторности 1-4				Повторности 1-4				Повторности 1-4			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	RS разведение 1	RS разведение 1	RS разведение 1	RS разведение 1	TS 1 разведение 1	TS 1 разведение 1	TS 1 разведение 1	TS 1 разведение 1	TS 2 разведение 1	TS 2 разведение 1	TS 2 разведение 1	TS 2 разведение 1
<b>B</b>	RS разведение 2	RS разведение 2	RS разведение 2	RS разведение 2	TS 1 разведение 2	TS 1 разведение 2	TS 1 разведение 2	TS 1 разведение 2	TS 2 разведение 2	TS 2 разведение 2	TS 2 разведение 2	TS 2 разведение 2
<b>C</b>	RS разведение 3	RS разведение 3	RS разведение 3	RS разведение 3	TS 1 разведение 3	TS 1 разведение 3	TS 1 разведение 3	TS 1 разведение 3	TS 2 разведение 3	TS 2 разведение 3	TS 2 разведение 3	TS 2 разведение 3
<b>D</b>	RS разведение 4	RS разведение 4	RS разведение 4	RS разведение 4	TS 1 разведение 4	TS 1 разведение 4	TS 1 разведение 4	TS 1 разведение 4	TS 2 разведение 4	TS 2 разведение 4	TS 2 разведение 4	TS 2 разведение 4
<b>E</b>	RS разведение 5	RS разведение 5	RS разведение 5	RS разведение 5	TS 1 разведение 5	TS 1 разведение 5	TS 1 разведение 5	TS 1 разведение 5	TS 2 разведение 5	TS 2 разведение 5	TS 2 разведение 5	TS 2 разведение 5
<b>F</b>	RS разведение 6	RS разведение 6	RS разведение 6	RS разведение 6	TS 1 разведение 6	TS 1 разведение 6	TS 1 разведение 6	TS 1 разведение 6	TS 2 разведение 6	TS 2 разведение 6	TS 2 разведение 6	TS 2 разведение 6
<b>G</b>	FB	FB	FB	FB	FB	FB	FB	FB	FB	FB	FB	FB
<b>H</b>	Раствор сравнения	Раствор сравнения	Раствор сравнения	Раствор сравнения	Раствор сравнения	Раствор сравнения	Раствор сравнения	Раствор сравнения	Раствор сравнения	Раствор сравнения	Раствор сравнения	Раствор сравнения

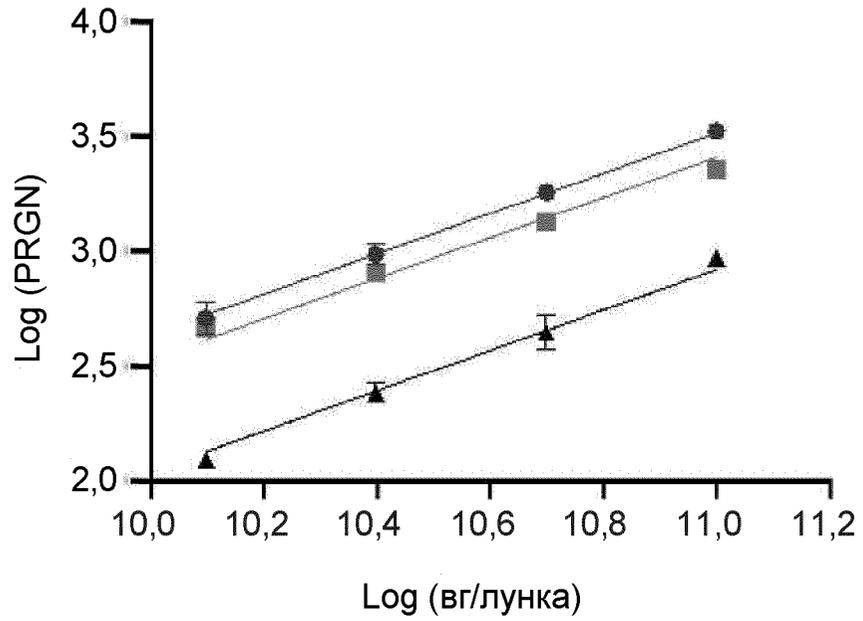
**ФИГ. 1**



- Образец 1
- Образец 2
- ▲ Образец 3
- ▼ Образец 4
- ◆ Образец 5

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



- Образец 1
- Образец 2
- ▲ Образец 3

Образец	Относительная активность (по сравнению с партией ТОХ)
Образец 1	626%
Образец 2	474%
Образец 3	131%

**ФИГ. 3**