

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391353 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.03

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

(22) Дата подачи заявки
2021.11.01

(54) ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ПРИМЕСЕЙ В ОБРАЗЦАХ И СОСТАВАХ КОМПОЗИЦИЙ
АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА (AAV) ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ AAV

(31) 63/108,480

(32) 2020.11.02

(33) US

(86) PCT/US2021/057587

(87) WO 2022/094411 2022.05.05

(88) 2022.06.02

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

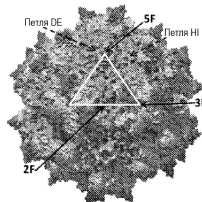
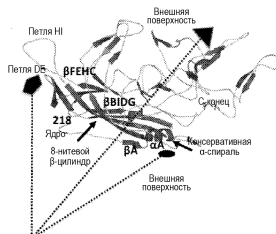
(72) Изобретатель:

Лю Динцзян, Цзян Бауэн, Тзул
Франко (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Представлены способы для характеристики примесей ДНК в образцах или биофармацевтических препаратах векторов аденоассоциированного вируса (AAV), включающие в себя применение эксклюзионной хроматографии по размеру и спектрофотометрии. Также представлены способы и композиции для минимизации утечки упакованной ДНК из вектора AAV, включающие в себя применение эксципиентов, таких как сахар, аминокислота, поверхностно-активное вещество или полиолы.



A1

202391353

202391353

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578026EA/042

ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ПРИМЕСЕЙ В ОБРАЗЦАХ И СОСТАВАХ КОМПОЗИЦИЙ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА (AAV) ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ AAV ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка испрашивает приоритет и преимущество относительно предварительной заявки на патент США № 63/108480, поданной 02 ноября 2020 года, которая настоящим включена в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данное изобретение в целом относится к способам для характеристики примесей нуклеиновых кислот в образцах векторов аденоассоциированного вируса (AAV) с использованием эксклюзионной хроматографии по размеру и спектрофотометрии. В данном изобретении также представлены способы и композиции для минимизации утечки упакованной ДНК из вектора AAV.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Генная терапия опосредует терапевтические эффекты путем доставки соответствующего количества терапевтического гена в целевую ткань без существенной токсичности, при этом достигается длительная экспрессия гена, например, путем интеграции генетического материала в геном хозяина. Генная терапия может включать в себя нуклеиновые кислоты, плазмиды, вирусы, векторы или полученные способами генной инженерии микроорганизмы. Из всех доступных в настоящее время вирусных векторов, включительно с ретровирусными, лентивирусными, аденовирусными векторами и векторами AAV, векторы AAV широко применяются для доставки генетического материала для генной терапии.

Оценка продуктов для генной терапии включает в себя оценку производственных процессов для обеспечения безопасности и качества продукта, а также оценку продукта на этапах его изготовления, хранения и распространения. Поскольку продукты для генной терапии, как правило, хранятся в виде замороженных растворов, важно продемонстрировать стабильность продуктов для генной терапии в циклах замораживания-оттаивания и при нагрузке перемешивания. Продукты для генной терапии на основе вектора AAV могут подвергаться деградации во время циклов замораживания-оттаивания с образованием продуктов деградации, включающих в себя деградированные вирусные белки и примеси ДНК. Упакованный геном AAV внутри векторов может просочиться наружу во время циклов замораживания-оттаивания или перемешивания. Следовательно, необходимо исследовать различные стратегии приготовления составов для генной терапии, чтобы получить составы, повышающие стабильность продукта и минимизирующие его деградацию.

Следует понимать, что существует потребность в способах для характеристики примесей нуклеиновых кислот в таких продуктах для генной терапии при различных условиях хранения. В дополнение к этому, также существует потребность в получении

композиций или составов, содержащих векторы AAV, имеющие терапевтический ген, которые минимизируют утечку упакованной ДНК из векторов AAV.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном изобретении представлены способы для характеристики и идентификации примесей нуклеиновых кислот в образцах, содержащих векторы AAV или продукты для генной терапии, включающие в себя применение эксклюзионной хроматографии по размеру и спектрофотометрии. В данном изобретении также представлены способы и композиции для минимизации утечки упакованной ДНК из векторов AAV в условиях их хранения, таких как циклы замораживания-оттаивания и стресс перемешивания, что может происходить во время производства, транспортировки, хранения и введения.

В данном изобретении представлен способ идентификации примесей нуклеиновых кислот в образце, содержащем векторы AAV. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения представлен способ, включающий в себя: приведение образца, содержащего векторы AAV, в контакт с колонкой эксклюзионной хроматографии по размеру (ЭХР, англ. «SEC»), промывку указанной колонки ЭХР раствором для получения по меньшей мере одного элюента и идентификацию примесей нуклеиновых кислот в указанном по меньшей мере одном элюенте с помощью спектрофотометра. В одном аспекте данного изобретения указанные примеси нуклеиновых кислот представляют собой одноцепочечные ДНК (оцДНК) - геномы AAV. В другом аспекте данного изобретения указанные примеси нуклеиновых кислот представляют собой двухцепочечные ДНК (дцДНК). В другом аспекте данного изобретения способ согласно данному изобретению дополнительно включает в себя измерение абсорбции по меньшей мере одного элюента при 280 нм с использованием спектрофотометра и измерение коэффициента абсорбции по меньшей мере одного элюента при 260/280 нм с использованием спектрофотометра. В одном аспекте данного изобретения способ согласно данному изобретению дополнительно включает в себя количественное определение примесей нуклеиновых кислот на основе стандартной кривой нуклеиновых кислот. В одном аспекте данного изобретения способ согласно данному изобретению дополнительно включает в себя обработку примесей нуклеиновых кислот флуоресцентным красителем, специально связывающимся с оцДНК. В другом аспекте данного изобретения способ согласно данному изобретению дополнительно включает в себя приведение образца в контакт с ДНК-нуклеазой до приведения указанного образца в контакт с колонкой ЭХР. В дополнительном аспекте данного изобретения система ЭХР представляет собой систему эксклюзионной сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии по размеру (ЭХР-СВЭЖХ, англ. «SE-UPLC»). В другом аспекте данного изобретения способ согласно данному изобретению дополнительно включает в себя подвергание указанного по меньшей мере одного элюента секвенированию нового поколения (СНП, англ. «NGS»).

В данном изобретении, по меньшей мере частично, представлена композиция для

защиты векторов AAV от утечки упакованных нуклеиновых кислот. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения представлена композиция, содержащая по меньшей мере один вектор AAV и по меньшей мере один эксципиент; при этом указанный по меньшей мере один эксципиент представляет собой сахар, аминокислоту, поверхностно-активное вещество или полиол; при этом указанный по меньшей мере один вектор AAV содержит упакованные нуклеиновые кислоты; и при этом указанный по меньшей мере один вектор AAV в указанной композиции защищен от утечки указанных упакованных нуклеиновых кислот.

В одном аспекте данного изобретения указанный вектор AAV в композиции согласно данному изобретению подвергнут по меньшей мере одному циклу замораживания-оттаивания. В одном аспекте данного изобретения указанные упакованные нуклеиновые кислоты представляют собой оцДНК-геномы AAV, при этом указанные упакованные нуклеиновые кислоты присутствуют внутри капсида AAV. В одном аспекте данного изобретения указанный эксципиент композиции согласно данному изобретению присутствует в концентрации от около 0,001% до около 10%, при этом указанная композиция дополнительно содержит фосфатно-солевой буфер и неионное поверхностно-активное вещество. В другом аспекте данного изобретения указанный сахар в композиции согласно данному изобретению представляет собой сахарозу, трегалозу, маннит, рафинозу, лактозу, глюкозу, мальтозу, мальтотриозу, мальтотетрозу, мальтопентозу или мальтогептозу. В одном аспекте данного изобретения указанная аминокислота в композиции согласно данному изобретению представляет собой пролин. В одном аспекте данного изобретения указанное поверхностно-активное вещество в композиции согласно данному изобретению представляет собой полоксамер 188 (Плюроник® F68). В одном аспекте данного изобретения указанное поверхностно-активное вещество в композиции согласно данному изобретению представляет собой неионное поверхностно-активное вещество, при этом указанное поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации от около 0,001% до около 0,2%. В другом аспекте данного изобретения указанная композиция включает в себя сахарозу и полоксамер 188. В конкретном аспекте данного изобретения указанная композиция включает в себя сахарозу в концентрации от 2,5% до 10% и полоксамер 188 в концентрации от 0,001% до 0,2%.

В данном изобретении, по меньшей мере частично, представлен способ для защиты векторов AAV от утечки упакованных нуклеиновых кислот. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанный способ включает в себя: получение образца, включающего в себя по меньшей мере один вектор AAV, и добавление к указанному образцу стабилизирующей композиции для образования защитного состава, при этом указанный защитный состав защищает указанный по меньшей мере один вектор AAV от утечки упакованных нуклеиновых кислот, указанная стабилизирующая композиция содержит по меньшей мере один эксципиент и указанный эксципиент представляет собой сахар, аминокислоту, поверхностно-активное вещество или полиол. В одном аспекте данного изобретения указанный вектор AAV подвергнут по

меньшей мере одному циклу замораживания-оттаивания. В одном аспекте данного изобретения указанные упакованные нуклеиновые кислоты представляют собой оцДНК-геном AAV, при этом указанные упакованные нуклеиновые кислоты присутствуют внутри капсида AAV.

В другом аспекте данного изобретения указанный эксципиент присутствует в концентрации от около 0,001% до около 10% в указанном защитном составе, при этом указанная стабилизирующая композиция дополнительно содержит фосфатно-солевой буфер и неионное поверхностно-активное вещество. В одном аспекте данного изобретения указанный сахар представляет собой сахарозу, трегалозу, маннит, рафинозу, лактозу, глюкозу, мальтозу, мальтотриозу, мальтотетрозу, мальтопентозу или мальтогептозу. В еще одном аспекте данного изобретения указанная аминокислота представляет собой пролин. В одном аспекте данного изобретения указанное поверхностно-активное вещество представляет собой полоксамер 188 (Плюроник® F68). В одном аспекте данного изобретения указанное поверхностно-активное вещество представляет собой неионное поверхностно-активное вещество, при этом указанное поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации от около 0,001% до около 0,2% в защитном составе. В другом аспекте данного изобретения указанная стабилизирующая композиция включает в себя сахарозу и полоксамер 188. В конкретном аспекте данного изобретения указанная стабилизирующая композиция включает в себя сахарозу в конечной концентрации от 2,5% до 10% в указанном защитном составе, и указанная стабилизирующая композиция включает в себя полоксамер 188 в конечной концентрации от 0,001% до 0,2% в указанном защитном составе.

Эти и другие аспекты данного изобретения будут более очевидны и понятны при рассмотрении в сочетании с нижеследующим описанием и прилагаемыми графическими материалами. Нижеследующее описание, хотя и указывает на различные варианты осуществления данного изобретения и их многочисленные конкретные детали, представлено в качестве иллюстрации, а не ограничения. В рамках объема данного изобретения могут выполняться множество замен, модификаций, дополнений или перестановок.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1 показана структура вектора AAV1, включительно с кристаллической структурой мономера VP3 капсида AAV1 и представлением поверхности капсида AAV1 в соответствии с Venkatakrishnan et al.

На фиг. 2 проиллюстрировано влияние замораживания-оттаивания на вектор AAV с защитным составом и без него в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 3 показана абсорбция фракций ЭХР для образцов AAV8-GFP, наблюдаемая при 280 нм, в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления данного изобретения. В колонки ЭХР загружали различные количества образцов AAV8-GFP, такие как 1 мкл, 5 мкл, 10 мкл, 15 мкл или 20 мкл образцов, в соответствии с иллюстративным

вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 4 показаны интенсивности флуоресценции фракций ЭХР для образцов AAV8-GFP, наблюдаемые при возбуждении при 280 нм и излучении при 350 нм, в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 5 показана абсорбция фракций ЭХР для образцов AAV8-GFP, наблюдаемая при 280 нм, в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления данного изобретения. В колонки ЭХР загружали различные концентрации (титры) образцов AAV8-GFP, в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 6 показано количественное определение концентраций оцДНК в образцах AAV8-GFP после различного числа циклов замораживания-оттаивания и воздействия перемешиванием в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 7 показана хроматограмма ЭХР-СВЭЖХ для AAV8.GFP в момент времени $t=0$ (жирная линия) и после десяти циклов замораживания-оттаивания (3/О, пунктирная линия) в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 8 показана хроматограмма ЭХР-СВЭЖХ для AAV8.GFP при воздействии бензоназой (жирная линия) и без него (пунктирная линия) в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 9А показан процент примеси пика ДНК на хроматограмме ЭХР-СВЭЖХ для AAV8.GFP в различных составах после десяти циклов замораживания-оттаивания (3/О) в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления данного изобретения. На фиг. 9В показано количество оцДНК, вытекшей из AAV8.GFP, в различных составах после десяти циклов замораживания-оттаивания (3/О) в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 10А показано количество свободной оцДНК, вытекшей из AAV2, AAV3b, AAV5, AAV7 и AAVDJ, после 10 циклов замораживания-оттаивания (3/О), измеренное с помощью набора реактивов Quant-iT ssDNA kit, в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления данного изобретения. На фиг. 10В показан процент примеси пика ДНК на хроматограмме ЭХР-СВЭЖХ в AAV2, AAV3b, AAV5, AAV7 и AAVDJ после десяти циклов замораживания-оттаивания (3/О) в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 11 представлен анализ гидродинамического радиуса вирусных частиц в образцах AAV8-GFP с помощью ДРС для скрининга различных эксципиентов при использовании разных составов для уменьшения утечки ДНК из капсидов AAV в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления данного изобретения. Примеси ДНК в образцах AAV8-GFP характеризовали до и после воздействия десяти циклов замораживания-оттаивания (3/О) в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 12А показано количество свободной оцДНК, вытекшей из AAV8.GFP, в

составах с различными концентрациями сахарозы, пропиленгликоля или плуроника F68 после 1, 2 или 4 циклов замораживания-оттаивания (З/О) в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления данного изобретения. На фиг. 12В показан процент примеси пика ДНК на хроматограмме ЭХР-СВЭЖХ для AAV8.GFP в составах с различными концентрациями сахарозы, пропиленгликоля или плуроника F68 после 1, 2 или 4 циклов замораживания-оттаивания (З/О) в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 13А показано количество свободной оцДНК, вытекшей из AAV2, AAV3b, AAV5, AAV7, AAV8 и AAVDJ, в основном составе (ОснС) или в оптимизированном составе (ОптС) после десяти циклов замораживания-оттаивания (З/О) в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления данного изобретения. На фиг. 13В показан процент примеси пика ДНК на хроматограмме ЭХР-СВЭЖХ для AAV2, AAV3b, AAV5, AAV7, AAV8 и AAVDJ в основном составе (ОснС) или в оптимизированном составе (ОптС) после десяти циклов замораживания-оттаивания (З/О) в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления данного изобретения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Генная терапия открыла перспективы изменения, восстановления или замены поврежденных или мутировавших генов для улучшения состояния здоровья пациента. Векторы аденоассоциированного вируса (AAV) являются идеальным инструментом для доставки генов, и они стали превосходными векторами для генной терапии человека. AAV могут быть сконструированы для выполнения определенных функций по доставке нуклеиновых кислот для применений в генной терапии. Ключевые преимущества AAV включают в себя низкую иммуногенность и патогенность, а также общую высокую безопасность и стабильность (Naso et al., *BioDrugs* 31 (4) (2017) 317-334; During, *Adv Drug Deliv Rev* 27 (1) (1997) 83-94). AAV могут инфицировать широкий спектр клеток, независимо от активного клеточного деления, вызывая при этом мягкий иммунный ответ, который продлевает продолжительность экспрессии трансгена (During; Carter, *Curr Opin Biotech* 3 (5) (1992) 533-539; Daya and Berns, *Clin Microbiol Rev* 21 (4) (2008) 583-593). В дополнение к этому, AAV не связаны ни с каким известным заболеванием (Naso et al.; During; Carter; Daya and Berns; Xiao et al., *Adv Drug Deliv Rev* 12 (3) (1993) 201-215; Muzyczka, *Viral Expression Vectors*, Springer, 1992, pp. 97-129). Другим преимуществом AAV как средства доставки генов является низкий риск случайной интеграции генома, которая может нарушить функцию гена и потенциально вызвать инсерционный мутагенез (Goswami et al., *Front Oncol* 9 (2019) 297; Nguyen et al., *Blood* 134 (Supplement_1) (2019) 611-611; Lundstrom, *Diseases* 6 (2) (2018) 42).

AAV являются вирусами без оболочки и непатогенными представителями семейства Parvoviridae рода Adenovirus, и для инфицирования требуют хелперов, таких как аденовирус или герпесвирус (Venkatakrishnan et al., *Structure and Dynamics of Adeno-Associated Virus Serotype 1 VP1- Unique N-Terminal Domain and Its Role in Capsid Trafficking*, *Journal of Virology*, May, 2013, vol. 87, no. 9, pages 4974-4984). AAV

инкапсулируют оцДНК-геном размером около 4,8 тысяч пар оснований (т. п. о.) в икосаэдрический капсид, который состоит из оболочки из белков, называемых капсидными вирусными белками. На фиг. 1 показана структура AAV1, включительно с кристаллической структурой мономера VP3 капсида AAV1 и представлением поверхности капсида AAV1 (Venkatakrishnan et al.). Кроме формирования внешней оболочки капсида, капсидные вирусные белки активно участвуют в связывании клеток и в интернализации.

AAV состоит из трех капсидных белков, VP1, VP2 и VP3, с одноцепочечной ДНК (оцДНК), заключенной в капсид (Agbandje-McKenna and Kleinschmidt, Adeno-Associated Virus, Springer 2012, pp. 47-92; Drouin and Agbandje-McKenna, Future virology 8(12) (2013) 1183-1199). После связывания с клеточными рецепторами AAV затем проходят эндоцитоз и высвобождаются из эндосомы перед транспортировкой к ядру хозяина и снятием оболочки для высвобождения оцДНК из их капсидов. Логично предположить, что эффективность трансдукции зависит, по меньшей мере частично, от количества заключенного в оболочку оцДНК-генома и целостности AAV до достижения места высвобождения (Nonnenmacher and Weber, Gene Ther 19 (6) (2012) 649-658; Hauck et al., J Virol 78 (24) (2004) 13678-13686; Thomas et al., J Virol 78(6) (2004) 3110-3122).

Для мониторинга качества и эффективности рекомбинантных AAV как векторов для доставки генов важно мониторировать чистоту, идентификационные характеристики капсидов, титр векторных частиц и соотношение пустой вектор/вектор со вставкой в биофармацевтических препаратах AAV. Также важно продемонстрировать стабильность биофармацевтических препаратов AAV при различных условиях хранения (таких как хранение при стабильной температуре и циклы замораживания-оттаивания), разбавителях (таких как сыворотка и растворенные вещества с различным значением pH) и введении. Продукты для генной терапии, такие как биофармацевтические препараты AAV, как правило, хранятся в виде замороженных растворов. В результате этого неизбежны циклы замораживания-оттаивания во время производства, приготовления дозы продукта и введения. В редких случаях изменение температуры во время транспортировки или неисправность морозильных камер во время хранения могут привести к дополнительным циклам замораживания-оттаивания биологических препаратов. Биофармацевтические препараты AAV могут подвергаться деградации со сниженной стабильностью во время циклов замораживания-оттаивания в условиях хранения.

В академических лабораториях, приложив огромные усилия для проектирования и разработки AAV как вектора для доставки генов, исследователи обычно хранят векторы в широко используемом буфере, таком как фосфатно-солевой буфер (ФСБ), добавляют относительно высокие концентрации глицерола в качестве криопротектора и хранят материал AAV при температуре -80°C. Хотя это стало в некоторой степени стандартным протоколом, данные условия потенциально могут нарушить функцию AAV (Boyd, Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations (1999) 383; Croyle et al. Gene Ther 8 (17) (2001) 1281-1290). В некоторых случаях может также потребоваться значительное разведение перед введением для снижения токсичности криопротекторов (Lee et al.,

Journal of Assisted Reproduction and Genetics 23 (2) (2006) 87-91; Armitage et al., Cryobiology 50 (1) (2005) 17-20). Исследования показали, что титры и эффективность трансдукции AAV снижаются после многократных циклов замораживания-оттаивания; однако причина такого поведения и механизм деградации AAV после циклов замораживания-оттаивания изучены плохо (Croyle et al.; Rodrigues et al., Pharm Res, 2019, 36 (2): 29; Howard and Harvey, Human Gene Therapy Methods 28 (1) (2017) 39-48).

В данном изобретении представлен способ характеристики примесей в образцах AAV. Применяя способ согласно данному изобретению, были охарактеризованы образцы AAV8, подвергнутые циклам замораживания-оттаивания, и было обнаружено, что увеличение числа циклов замораживания-оттаивания приводит к повышению уровня примеси, связанной с продуктом, которая обнаруживается с помощью эксклюзионной сверхэффективной жидкостной хроматографии (ЭХР-СВЭЖХ). Дальнейшая характеристика данных образцов AAV8 показала, что указанная примесь в основном состоит из геномной ДНК, которая вытекает из капсида AAV. Подобное поведение наблюдалось и у других серотипов AAV.

Когда капсиды AAV повреждаются во время циклов замораживания-оттаивания, упакованный оцДНК-геном AAV внутри капсидов может просочиться наружу, как показано на фиг. 2. Наблюдаемое присутствие свободной оцДНК в биофармацевтических препаратах AAV указывает на снижение стабильности биофармацевтических препаратов AAV во время хранения. Для повышения стабильности продукта и минимизации его деградации в продукты для доставки генов могут быть добавлены различные эксципиенты. Эксципиент может включать в себя буфер, лиопротектор, агент регуляции тоничности и поверхностно-активное вещество (Rodrigues et al.). Дополнительные составы подробно описаны ниже.

Существует потребность в способах для характеристики примесей ДНК в образцах AAV или биофармацевтических препаратах AAV при различных условиях хранения. В дополнение к этому, необходимо обеспечить стабилизирующие композиции или составы биофармацевтических препаратов AAV, чтобы минимизировать утечку упакованной ДНК из векторов AAV в условиях хранения.

В данном изобретении представлены способы для идентификации примесей ДНК, таких как оцДНК-геномы AAV, в образцах AAV или биофармацевтических препаратах AAV, включающие в себя использование ЭХР для отделения примесей ДНК от вектора AAV. Впоследствии фракции ЭХР мониторируют с помощью спектрофотометра. В данном изобретении также представлены способы и композиции для минимизации утечки упакованной ДНК из векторов AAV, включающие в себя использование эксципиентов в присутствии фосфатного буфера, соли и неионного поверхностно-активного вещества.

Существует необходимость в разработке быстрых, надежных, чувствительных и высокопроизводительных способов для определения и мониторинга примесей в биофармацевтических препаратах AAV. Любой компонент в очищенных биофармацевтических препаратах AAV, который не является желаемым продуктом,

субстанцией, связанной с продуктом, или предусмотренным эксципиентом состава, может рассматриваться как примесь. Примеры примесей, связанных с векторным продуктом, включают в себя пустые частицы капсида AAV и частицы AAV, инкапсулирующие непреднамеренные фрагменты нуклеиновой кислоты. Дополнительные примеси ДНК могут включать в себя оцДНК геномов AAV, которые вытекают из капсидов AAV во время очистки, после очистки или во время хранения. Примеси могут включать в себя AAV-частицы, зависящие от хелперного вируса и обладающие способностью к репликации, которые могут непреднамеренно генерироваться в результате событий рекомбинации в биосинтетической среде системы генерации вектора.

Кроме того, примеси в биофармацевтических препаратах AAV могут также включать в себя остаточные уровни белков и нуклеиновых кислот, происходящих из культур клеток, которые используются для получения AAV. Обильные остаточные белковые примеси могут включать в себя белки клетки-хозяина и бычий сывороточный альбумин. Обильные остаточные нуклеиновые кислоты могут включать в себя ДНК/РНК клетки-хозяина и ДНК из вспомогательных компонентов, таких как плазмиды или вирусы. Остаточная ДНК клетки-хозяина может присутствовать в двух формах, включающих в себя чувствительные к нуклеазе примеси, связанные с процессом, и устойчивые к нуклеазе примеси, связанные с продуктом. Чувствительные к нуклеазе примеси, связанные с процессом, включают в себя нуклеиновые кислоты, которые неспецифически совместно очищаются с желаемыми продуктами вектора AAV. Устойчивые к нуклеазе примеси, связанные с продуктом, включают в себя нуклеиновые кислоты, которые инкапсулированы внутри частиц AAV. Минимизация данных различающихся форм остаточной ДНК клетки-хозяина требует различных стратегий оптимизации производственного процесса (J. F. Wright, Product-related impurities in clinical-grade recombinant AAV vectors: characterization and risk assessment, *Biomedicines*, 2014, 2, 80-97). Удаление примесей ДНК в биофармацевтических препаратах AAV является сложной задачей, даже несмотря на то, что используется обработка нуклеазой для удаления доступных нуклеиновых кислот во время очистки вектора AAV. Нежелательные фрагменты ДНК могут быть упакованными, а значит - устойчивыми к обработке нуклеазой вследствие целостности векторных частиц.

Поскольку капсиды AAV инкапсулируют оцДНК-геном в икосаэдрический капсид, который состоит из оболочки из белков, например, капсидных вирусных белков, капсиды должны быть стабильными для защиты генома AAV до тех пор, пока не появится подходящая клетка-хозяин, которая инициирует проникновение в клетку для высвобождения геномов AAV для репликации. Сборка вирусных капсидных белков AAV может оказывать значительное влияние на инфекционность вируса и активность вектора (Jin et al., Direct liquid chromatography/mass spectrometry analysis for complete characterization of recombinant adeno-associated virus capsid proteins, *Human gene therapy methods*, 2017, Vol. 28, No. 5, pages 255-267). Капсидные вирусные белки AAV могут играть роль в инициации как синтеза второй нити, так и транскрипции вводимого генома

(Salganik et al., Adeno-associated virus capsid proteins may play a role in transcription and second-strand synthesis of recombinant genomes, *Journal of Virology*, January 2014, Vol. 88, No. 2, pages 1071-1079). Деградация капсидных белков может отрицательно сказываться на инфекционности AAV, что может привести к утечке оцДНК-генома AAV. ОцДНК-геном AAV также может выделяться без разрушения капсида (Bernaud, Julien, et al. Characterization of AAV vector particle stability at the single-capsid level. *Journal of biological physics*, 2018, Vol. 44, No. 2, pages 181-194).

Геномы оцДНК AAV содержат три гена, которые включают в себя гены гер (репликация), сар (капсид) и аар (сборка). Ген гер необходим для репликации и упаковки вирусного генома. Ген сар кодирует капсидные вирусные белки. В результате экспрессии гена сар продуцируются капсидные вирусные белки, включительно с VP1, VP2 и VP3, образующиеся в результате трансляции претерпевших альтернативный сплайсинг мРНК с общими С-концами. VP3 имеет массу около 61 кДа, и он составляет около 85% содержания капсидных белков. VP2 имеет массу около 73 кДа. VP1 имеет массу около 87 кДа. VP1 и VP2 содержат N-концевое удлинение (VP1u), включающее в себя домен фосфолипазы A2 и сигналы ядерной локализации (Rayaprolu et al., Comparative analysis of adeno-associated virus capsid stability and dynamics, *Journal of Virology*, December 2013, vol. 87, No. 24, p. 13150-13160). Капсид AAV состоит из 60 мономеров вирусного белка, включающих в себя VP1, VP2 и VP3. VP3 является главным капсидным белком. В капсиде AAV находится около 50 копий VP3. В капсиде AAV находится около 5 копий VP1 и 5 копий VP2 (Venkatakrishnan et al.).

В данном изобретении представлены способы для характеристики, идентификации и (или) количественного определения примесей ДНК в образцах AAV или биофармацевтических препаратах AAV, включающие в себя использование ЭХР для отделения примесей ДНК от вектора AAV. Впоследствии фракции ЭХР мониторируют с помощью спектрофотометра. В данном изобретении также представлены способы и композиции для минимизации утечки упакованной ДНК из векторов AAV, включающие в себя использование эксципиентов в присутствии ФСБ и неионного поверхностно-активного вещества. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения представлен способ идентификации примесей ДНК в образце, содержащем векторы AAV, включающий в себя: приведение указанного образца в контакт с колонкой ЭХР, промывку указанной колонки ЭХР раствором для получения элюентов и идентификацию примесей нуклеиновых кислот в указанных элюентах с помощью спектрофотометра. Образцы, содержащие векторы AAV, загружают в колонки ЭХР. Фракции, проходящие через колонку ЭХР, мониторируют с помощью спектрофотометра для измерения абсорбции фракций ЭХР при 280 нм. Во фракциях ЭХР, в профиле элюирования ЭХР, можно наблюдать один главный пик, соответствующий векторам AAV. Данный главный пик имеет значительную абсорбцию при длине волны 280 нм, обнаруживаемую с помощью спектрофотометра. Во фракциях ЭХР, в профиле элюирования ЭХР, наблюдается один небольшой пик, соответствующий примесям ДНК.

Данный небольшой пик имеет абсорбцию при 280 нм, обнаруживаемую с помощью спектрофотометра.

В одном аспекте данного изобретения примеси ДНК в образцах, содержащих векторы AAV, представляют собой оцДНК-геномы AAV. В одном аспекте данного изобретения фракции ЭХР анализируют с помощью спектрофотометра для измерения коэффициента абсорбции при УФ 260/280 нм для оценки чистоты нуклеиновых кислот. В одном аспекте данного изобретения способ согласно данному изобретению включает в себя измерение абсорбции элюента при 280 нм и измерение коэффициента абсорбции элюента при 260/280 нм с использованием спектрофотометра. В одном аспекте данного изобретения способ согласно данному изобретению дополнительно включает в себя количественное определение примесей ДНК на основе стандартной кривой нуклеиновых кислот в комбинации с обработкой примесей ДНК флуоресцентным красителем.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения представлены способы и стабилизирующие композиции для защиты векторов AAV от утечки упакованных нуклеиновых кислот в условиях их хранения, таких как циклы замораживания-оттаивания и стресс перемешивания. В некоторых аспектах данного изобретения указанная стабилизирующая композиция, содержащая векторы AAV и эксципиенты, включает в себя сахар, аминокислоту, поверхностно-активное вещество или полиолы. В некоторых аспектах данного изобретения указанный способ для защиты вектора AAV от утечки упакованных нуклеиновых кислот включает в себя смешивание указанного вектора AAV с указанной стабилизирующей композицией.

В одном аспекте данного изобретения указанный эксципиент стабилизирующей композиции согласно данному изобретению присутствует в концентрации от около 0,001% до около 10%, при этом указанная стабилизирующая композиция дополнительно содержит фосфатно-солевой буфер и неионное поверхностно-активное вещество. В одном аспекте данного изобретения указанный сахар в стабилизирующей композиции согласно данному изобретению представляет собой сахарозу, трегалозу, маннит, рафинозу, лактозу, глюкозу, мальтозу, мальтотриозу, мальтотетрозу, мальтопентозу или мальтогептозу. В другом аспекте данного изобретения указанная аминокислота в стабилизирующей композиции согласно данному изобретению представляет собой пролин. В еще одном аспекте данного изобретения указанное поверхностно-активное вещество в стабилизирующей композиции согласно данному изобретению представляет собой Плурионик® F68. В одном аспекте данного изобретения указанное поверхностно-активное вещество в стабилизирующей композиции согласно данному изобретению представляет собой неионное поверхностно-активное вещество, при этом указанное поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации от около 0,001% до около 0,2%.

Необходимость оценки продуктов генной доставки для обеспечения безопасности и качества продуктов привела к росту спроса на характеризацию примесей ДНК в образцах AAV или биофармацевтических препаратах AAV при различных условиях хранения. В дополнение к этому, также существует потребность в получении композиций

или составов, содержащих биофармацевтические препараты AAV, для минимизации утечки упакованной ДНК из векторов AAV. Описанные в данном документе иллюстративные варианты осуществления данного изобретения удовлетворяют вышеупомянутые потребности путем предоставления способов и композиций для удовлетворения давно испытываемых потребностей.

Термин в единственном числе следует понимать как означающий «по меньшей мере один»; термины «около» и «приблизительно» следует понимать как допускающие стандартные вариации, как их понимают рядовые специалисты в данной области техники; для всех указанных в данном документе диапазонов в их объем включаются крайние точки указанных диапазонов. При употреблении в контексте данного документа термины «включают в себя», «включает в себя» и «включающий (-ая, -ее, -ие) в себя» не имеют ограничительного характера и понимаются как «содержат», «содержит» и «содержащий (-ая, -ее, -ие)», соответственно.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения представлен способ идентификации примесей нуклеиновых кислот в образце, содержащем векторы AAV, включающий в себя: приведение указанного образца, содержащего векторы AAV, в контакт с колонкой эксклюзионной хроматографии по размеру (ЭХР), промывку указанной колонки ЭХР раствором для получения по меньшей мере одного элюента и идентификацию примесей нуклеиновых кислот в указанном по меньшей мере одном элюенте с помощью спектрофотометра.

При употреблении в контексте данного документа термин «вектор» относится к рекомбинантным плазмиде или вирусу, которые содержат нуклеиновую кислоту, подлежащую доставке в клетку-хозяина, либо *in vitro*, либо *in vivo*.

Полученные на основе AAV векторы являются особенно перспективными для доставки генетического материала, поскольку: (i) они способны к инфицированию (трансдукции) широкого спектра неделящихся и делящихся типов клеток, включительно с мышечными волокнами и нейронами; (ii) они лишены вирусных структурных генов, благодаря чему исключены естественные ответы клетки-хозяина на вирусную инфекцию, например, интерферон-опосредованные ответы; (iii) вирусы дикого типа никогда не были ассоциированы с каким-либо патологическим состоянием у человека; (iv) в отличие от AAV дикого типа, которые способны к интеграции в геном клетки-хозяина, дефектные по репликации AAV-векторы, как правило, персистируют в виде episome, ограничивая тем самым риск инсерционного мутагенеза или активации онкогенов; и (v) в отличие от других векторных систем, AAV-векторы не провоцируют значительный иммунный ответ (см. ii), что обеспечивает длительную экспрессию терапевтических трансгенов (при условии, что их генные продукты не отторгаются).

При употреблении в контексте данного документа термин «примеси» относится к любому компоненту в очищенных образцах AAV, который не является желаемым продуктом, не является веществом, связанным с продуктом, или не является эксципиентом состава. Примеси ДНК могут включать в себя оцДНК генома AAV, которая

вытекает из капсидов AAV во время очистки, после очистки или во время хранения. Примеси могут включать в себя AAV-частицы, зависящие от хелперного вируса и обладающие способностью к репликации, которые могут непреднамеренно генерироваться в результате событий рекомбинации в биосинтетической среде системы генерации вектора. Примеси, остающиеся после очистки AAV, могут включать в себя остаточные уровни белков и нуклеиновых кислот, полученных из компонентов клеточной культуры, используемой для получения AAV. Остаточные белковые примеси могут включать в себя белки клетки-хозяина и бычий сывороточный альбумин. Остаточные нуклеиновые кислоты могут включать в себя ДНК/РНК клетки-хозяина и ДНК из вспомогательных компонентов, таких как плазмиды или вирусы. Остаточная ДНК клетки-хозяина может присутствовать в двух формах: (1) в виде примеси, связанной с чувствительным к нуклеазе процессом, например, примеси, неспецифически совместно очищенные с желаемыми AAV-векторными продуктами; и (2) в виде устойчивой к нуклеазе примеси, связанной с продуктом, например, примеси, заключенные внутри частиц AAV (J. F. Wright).

При употреблении в контексте данного документа «нуклеиновая кислота» относится к молекуле ДНК или РНК. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения термин «нуклеиновая кислота» охватывает собой последовательности, которые включают в себя любые из известных аналогов оснований ДНК и РНК, таких как следующие, но не ограничиваясь ими: 4-ацетилцитозин, 8-гидрокси-N6-метиладенозин, азиридинилцитозин, псевдоизоцитозин, 5-(карбоксигидроксилметил)-урацил, 5-фторурацил, 5-бром урацил, 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоурацил, 5-карбоксиметиламинометил-урацил, дигидроурацил, инозин, N6-изопентениладенин, 1-метиладенин, 1-метилпсевдоурацил, 1-метилгуанин, 1-метилюридин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N6-метиладенин, 7-метилгуанин, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, бета-D-маннозилквеозин, 5'-метоксикарбонилметил-урацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-N6-изопентениладенин, сложный метиловый эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, урацил-5-оксиуксусная кислота, оксibuтоксозин, псевдоурацил, квеозин, 2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, сложный метиловый эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, урацил-5-оксиуксусная кислота, псевдоурацил, квеозин, 2-тиоцитозин и 2,6-диаминопурин.

При употреблении в контексте данного документа термин «эксклюзионная хроматография по размеру», или «ЭХР», относится к хроматографическому способу, например, хроматографии на молекулярном сите, который позволяет разделять молекулы в растворе на основе их размера (например, молекулярной массы) путем фильтрации через матрицу. Матрица, такая как гель, состоит из сферических гранул, содержащих поры с определенным распределением по размерам. Когда молекулы разного размера включаются или исключаются из пор внутри гранул, молекулы могут быть разделены по

их размерам. Молекула, имеющая меньший размер, может диффундировать в поры, что увеличивает период времени, необходимый для прохождения меньшей молекулы через колонку ЭХР. Однако молекула, имеющая большой размер, не проникает в поры. Когда крупные молекулы не проникают в поры, они элюируются в пустом объеме колонки ЭХР. Как правило, период времени, за который большая молекула проходит через колонку ЭХР, является меньшим по сравнению с периодом времени для более мелких молекул. Следовательно, молекулы можно разделять по размеру с помощью колонки ЭХР, поскольку периоды времени прохождения молекул с разными размерами через колонку ЭХР являются различными. ЭХР можно применять для разделения крупных молекул или макромолекулярных комплексов, таких как белковые комплексы. Обычно буфер, используемый в ЭХР, составлен так, чтобы сохранить нативные структуры и конформации биомолекул в растворе, что позволяет отделять биомолекулы без нарушения их нативных структур и конформаций.

При употреблении в контексте данного документа термин «спектрофотометр» включает в себя прибор, который может количественно измерять интенсивность абсорбции света в зависимости от длины волны, такой как абсорбционный спектрофотометр. Спектрофотометр содержит монохроматор или призму для получения светового луча, содержащего желаемые длины волн, и средство измерения отношения интенсивности этого луча при входе в кювету или проточную ячейку и выходе из нее. В спектрофотометрах УФ - видимого спектра пучок света от подходящего источника УФ-излучения и (или) видимого света пропускается через призму или монохроматор с дифракционной решеткой. Затем свет проходит через анализируемый образец, прежде чем попасть на детектор. Спектрофотометр также может быть частью системы ЭХР-ВЭЖХ/СВЭЖХ и являться детектором.

Иллюстративные варианты осуществления данного изобретения

В вариантах осуществления данного изобретения, представленных в данном документе, представлены способы для характеристики и идентификации примесей ДНК в образцах AAV или биофармацевтических препаратах AAV. В вариантах осуществления данного изобретения, представленных в данном документе, также представлены способы и композиции для минимизации утечки упакованной ДНК из векторов AAV.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения представлен способ идентификации примесей нуклеиновых кислот в образце, содержащем векторы AAV, включающий в себя: приведение указанного образца, содержащего векторы AAV, в контакт с колонкой ЭХР, промывку указанной колонки ЭХР раствором для получения по меньшей мере одного элюента и идентификацию примесей нуклеиновых кислот в указанном по меньшей мере одном элюенте с помощью спектрофотометра. В одном аспекте данного изобретения указанные примеси нуклеиновых кислот представляют собой одноцепочечные ДНК - геномы AAV.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения представлена композиция для защиты векторов AAV от утечки упакованных нуклеиновых

кислот, при этом указанная композиция содержит по меньшей мере один эксципиент, включающий в себя сахар, аминокислоту, поверхностно-активное вещество или полиолы. В одном аспекте данного изобретения эксципиент композиции согласно данному изобретению присутствует в концентрации, составляющей от около 0,001% до около 10%, от около 0,001% до около 8%, от около 0,001% до около 6%, от около 0,05% до около 5%, от около 0,1% до около 10%, от около 0,1% до около 8%, от около 0,1% до около 6%, от около 0,1% до около 5%, около 5%, около 4%, около 3%, около 2,5%, около 2%, около 1,5%, около 1%, около 0,1%, около 0,05% или около 0,001%.

В одном аспекте данного изобретения указанная композиция дополнительно содержит фосфатно-солевой буфер и неионное поверхностно-активное вещество. В другом аспекте данного изобретения сахар в композиции согласно данному изобретению представляет собой сахарозу, трегалозу, маннит, рафинозу, лактозу, глюкозу, мальтозу, мальтотриозу, мальтотетрозу, мальтопентозу или мальтогептозу. В другом аспекте данного изобретения аминокислота в композиции согласно данному изобретению представляет собой пролин. В еще одном аспекте данного изобретения поверхностно-активное вещество в композиции согласно данному изобретению представляет собой Плурионик® F68. В одном аспекте данного изобретения указанное поверхностно-активное вещество в композиции согласно данному изобретению представляет собой неионное поверхностно-активное вещество, при этом указанное поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации от около 0,001% до около 0,2%, около 0,1%, около 0,05% или около 0,001%.

Следует понимать, что указанная система не ограничивается ни одним из вышеупомянутых аденоассоциированных вирусов, эксклюзионной хроматографией по размеру, спектрофотометром, оцДНК, векторами AAV и эксципиентами.

Последовательное обозначение этапов способа цифрами и (или) буквами в данном документе не предназначена для ограничения указанного способа или любых его вариантов осуществления конкретным указанным порядком. В данном документе цитируются различные публикации, включая патенты, заявки на патенты, опубликованные заявки на патенты, номера доступа, технические статьи и научные статьи. Каждая из этих цитируемых ссылок включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме для всех целей. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в контексте данного документа, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. Данное описание будет более полно понято со ссылкой на нижеследующие примеры, которые предоставлены для более подробного описания данного изобретения. Они предназначены для иллюстрации и их не следует рассматривать как ограничивающие объем данного изобретения.

ПРИМЕРЫ

Спектрофотометр: спектрофотометр использовали для обнаружения и мониторинга белков и нуклеиновых кислот во фракциях, полученных с помощью колонки

эксклюзионной хроматографии по размеру. Обнаружение белка выполняли с использованием коэффициента абсорбции при 280 нм. Обнаружение ДНК или РНК выполняли с использованием коэффициента абсорбции при 260 нм. Белки в растворе поглощают ультрафиолетовый свет с максимумами абсорбции при 280 и 200 нм. Аминокислоты с ароматическими кольцами имеют пик абсорбции при 280 нм. Нуклеиновые кислоты можно определять количественно путем измерения количества ультрафиолетового излучения, поглощаемого основаниями при 260 нм, с помощью спектрофотометра. Нуклеотиды ДНК содержат углеводный остов, основание и фосфатную группу. Основание богато азотом, который поглощает свет при 260 нм. Для длины пути света в 1 см оптическая плотность при 260 нм ($ОП_{260}$, абсорбция при 260 нм) равна 1,0 для следующих растворов: раствора двухцепочечной ДНК концентрацией 50 мкг/мл, раствора одноцепочечной ДНК концентрацией 33 мкг/мл, раствора олигонуклеотида концентрацией 20-30 мкг/мл или раствора РНК концентрацией 40 мкг/мл.

Образцы ДНК могут содержать примеси, которые могут влиять на абсорбцию при 260 нм. Коэффициент абсорбции при 260/280 нм анализировали для оценки чистоты нуклеиновых кислот. Чистая ДНК имеет коэффициент абсорбции при 260/280 нм, равный около 1,8-2,0. Чистая РНК имеет коэффициент абсорбции при 260/280 нм, равный около 2,0. Высококачественный образец ДНК или РНК должен иметь коэффициент абсорбции при 260/280 нм, равный больше чем около 1,7. Когда наблюдаемый коэффициент абсорбции при 260/280 нм для раствора ДНК или РНК низкий, это указывает на возможное загрязнение, вызванное белком или фенолом. Максимум абсорбции при 280 нм указывает на возможное загрязнение белком. Максимум абсорбции при 230 нм указывает на возможное загрязнение фенолятом или тиоцианатом. Максимум абсорбции при 340 нм указывает на рассеяние света, вызванное частицами.

Получение образца. Для исследований замораживания-оттаивания по 100 мкл растворов AAV в стеклянных флаконах объемом 1 мл замораживали при температуре -80°C в течение по меньшей мере одного часа и затем размораживали при комнатной температуре в течение по меньшей мере 30 минут для завершения одного цикла.

Чтобы охарактеризовать влияние бензоназы на пик 1 ЭХР-СВЭЖХ в раствор AAV8.GFP добавили бензоназу Benzonase® (Millipore Sigma, г. Берлингтон, штат Массачусетс, США) в объемном соотношении 1:50 и тщательно перемешивают перед анализом посредством ЭХР-СВЭЖХ.

Для исследований по скринингу составов различные серотипы AAV были скорректированы до титра генома, равного $3,7 \times 10^{12}$ вг/мл. Затем буфер для составов 2-кратной концентрации смешивали с образцами различных серотипов AAV для получения целевых составов, и данные образцы подвергали циклам замораживания-оттаивания. Анализ выполняли в момент времени $t=0$ и после 1, 2, 4 или 10 циклов замораживания-оттаивания.

ЭХР-СВЭЖХ. Образцы AAV8.GFP анализировали с использованием колонки для

ЭХР Sepax SEC 5 мкм, 4,6×300 нм с размером пор 500 Ангстрем, работающей в системе СВЭЖХ Waters ACQUITY UPLC. Калибровочную кривую строили путем введения 1, 5, 10, 15 и 20 мкл стандартов с концентрацией $1,83 \times 10^{12}$ вг/мл. Затем вводили по 10 мкл образцов AAV8 и элюировали со скоростью потока в 0,5 мл/мин с использованием 2х ДФСБ в качестве подвижной фазы. Элюирование мониторируют с помощью детектора с фотодиодной матрицей и регистрировали спектр в диапазоне от 210 до 400 нм для дальнейшего анализа.

Для фракционирования различных видов в профиле элюирования ЭХР-СВЭЖХ к системе ACQUITY UPLC был подключен анализатор Waters Fraction Manager-Analytical, который использовался для сбора фракций, элюированных при соответствующем времени удержания. Выполняли несколько повторных инъекций и объединяли фракции от многократных инъекций в единый пул с последующим 5-кратным концентрированием (уменьшением объема) с помощью центробежных фильтровальных установок Amicon Ultra-0.5. Собранные фракции подвергали секвенированию нового поколения (СНП) для подтверждения их идентификационных показателей.

Секвенирование нового поколения. Подготовку образцов выполняли с использованием протокола, описанного Lecomte et al., с незначительными изменениями (Lecomte et al., Molecular Therapy-Nucleic Acids 4 (2015) e260). Чтобы идентифицировать пик примеси (пик 1 в профиле ЭХР-СВЭЖХ перед главным пиком элюирования) проводили выделение ДНК без какой-либо обработки ДНКазой. Библиотеку Illumina подготавливали с использованием набора для подготовки ДНК-библиотек Nextera XT в соответствии с инструкциями производителя. Конечный пул секвенировали в NextSeq550 с использованием набора для промежуточной обработки на 150 циклов. Считывания последовательностей анализировали с использованием собственного конвейера анализа данных.

Анализ свободной ДНК, основанный на флуоресценции. Набор реактивов Quant-iT™ OliGreen® ssDNA Assay Kit (Invitrogen™) был приобретен у Thermo Fisher Scientific. Перед использованием 200-кратный исходный реактив Quant-iT OliGreen ssDNA и стандарт олигонуклеотидов концентрацией 100 мкг/мл разогревали до комнатной температуры. Исходный 20-кратный буфер ТЕ разбавляли 20-кратным количеством воды Milli-Q до рабочей концентрации (10 mM трис-HCl, 1 mM ЭДТА, pH 7,5). Затем использовали буфер ТЕ для разбавления реактива и стандарта олигонуклеотидов до рабочих концентраций в соответствии с руководством пользователя. Образцы AAV и стандартов олигонуклеотидов смешивали с указанным реактивом, используя соотношение, указанное в руководстве пользователя, и оцДНК в образцах AAV интерполировали с использованием стандартной линейной кривой, полученной из пяти образцов, содержащих различные концентрации (0, 10, 100, 500 и 1000 нг/мл) указанного стандарта олигонуклеотидов. Образцы помещали в 384-луночный планшет и анализировали с помощью многорежимного считывателя Synergy™ Neo2 Multi mode Reader (BioTek). Длины волн возбуждения и излучения были установлены на уровне 480

нм и 520 нм, соответственно.

Пример 1. Характеризация примесей ДНК в образцах AAV

AAV серотипа 8 (AAV8) был получен в клетках НЕК-293 и, как указано, содержал по меньшей мере 5×10^{12} копий генома/мл в Д-ФСБ с 0,001% Плюроник® F68. Для анализа примесей ДНК использовали AAV8, содержащий полезную нагрузку GFP (зеленый флуоресцентный белок), например, AAV8-GFP. Анализировали различные количества образцов AAV8-GFP с помощью колонок ЭХР, такие как 1 мкл, 5 мкл, 10 мкл, 15 мкл или 20 мкл образцов. Образцы AAV8-GFP загружали в колонки для эксклюзионной хроматографии по размеру (ЭХР). Фракции, проходящие через колонку ЭХР, мониторировали с помощью спектрофотометра для измерения абсорбции фракций ЭХР при 280 нм, как показано на фиг. 3. На фиг. 3 ось Y отображает абсорбцию при 280 нм в единицах абсорбции (ЕА), а ось X выражена как время удержания фракций, проходящих через колонку. Как показано на фиг. 3, во фракциях ЭХР, в профиле элюирования ЭХР, наблюдался один главный пик, соответствующий вирусным частицам AAV8-GFP, со временем удержания от 12 до 15 минут, который имел значительную абсорбцию при 280 нм, обнаруженную с помощью спектрофотометра. В профиле элюирования ЭХР наблюдался один небольшой пик, имеющий абсорбцию при 280 нм, со временем удержания от 8 до 11 минут, например, пик 1 на фиг. 3.

Показатели интенсивности флуоресценции фракций ЭХР также мониторировали при возбуждении при 280 нм и излучении при 350 нм, как показано на фиг. 4. На фиг. 4 ось Y отображает нормализованную интенсивность флуоресценции, а ось X выражена как время удержания фракций, проходящих через колонку ЭХР. Фракции, соответствующие главному пику из фиг. 3, проявлялись в виде похожего пика со значительной интенсивностью флуоресценции с тем же временем удержания, от 12 до 15 минут, как показано на фиг. 4. Фракции, соответствующие пику 1 из фиг. 3, не продемонстрировали обнаруживаемую интенсивность флуоресценции (при возбуждении при 280 нм и излучении при 350 нм) с соответствующим временем удержания - между 8 и 11 минутами, как показано на фиг. 4.

Кроме того, пик 1 и главный пик фракций ЭХР анализировали с помощью спектрофотометра для измерения коэффициента абсорбции при УФ 260/280 нм для оценки чистоты нуклеиновых кислот. Как показано в таблице 1, пик 1 фракций ЭХР продемонстрировал значение 1,7 при УФ 260/280 нм, что указывает на высокую чистоту ДНК без загрязнения белками. Фракции ЭХР главного пика продемонстрировали значение 1,3 при УФ при 260/280 нм, что указывает на присутствие белков. УФ-визуализация ЛС-массы (лекарственной субстанции, содержащей биофармацевтические препараты AAV) показала значение 1,3 для УФ при 260/280 нм, соответствующее очищенному вектору AAV. Когда образцы AAV8-GFP обрабатывали нуклеазами, интенсивность пика 1 значительно снижалась. Данные результаты продемонстрировали, что фракции ЭХР, соответствующие пику 1, содержат ДНК. Данный результат также продемонстрировал, что пик 1 фракций ЭХР может содержать оцДНК из генома AAV.

Таблица 1. Коэффициенты абсорбции при 260/280 нм для фракций ЭХР

Образцы	УФ 260/280 нм
ЭХР, пик 1	1,7
ЭХР, главный пик	1,3
УФ-визуализация ЛС-массы	1,3

Поскольку данные результаты показали, что пик 1 содержал ДНК высокой чистоты без загрязнения белками, комбинация ЭХР и измерения абсорбции может эффективно применяться для количественного определения примесей оцДНК в образцах AAV. Образцы AAV можно загружать в колонку ЭХР для отделения примесей ДНК от векторов AAV. Фракции ЭХР можно мониторировать по абсорбции при 280 нм для идентификации примесей ДНК и векторов AAV в профиле элюирования ЭХР. Впоследствии фракции ЭХР, содержащие примеси ДНК, можно количественно определять путем измерения абсорбции при 260 нм. Чистоту ДНК можно оценивать путем измерения коэффициента абсорбции при 260/280 нм. Примеси ДНК в очищенных образцах могут включать в себя оцДНК, которая вытекла из капсидов AAV при неправильных условиях хранения, таких как циклы замораживания-оттаивания и перемешивание.

Пример 2. Характеризация утечки оцДНК после воздействия циклов замораживания-оттаивания

В настоящее время лекарственные продукты AAV для генной терапии хранят в виде замороженных жидкостей, чтобы сохранить качество продукта и его стабильность; следовательно, частицы AAV подвергаются многократным циклам замораживания-оттаивания во время производства, транспортировки, хранения и введения. Следовательно, многократные циклы замораживания-оттаивания были выбраны в качестве одного из стрессовых условий в исследованиях по характеризации и определению стабильности, чтобы понять стабильность состава AAV8 и определить потенциальный путь деградации.

AAV8, содержащий полезную нагрузку GFP, использовали в качестве исходного материала для характеризации утечки оцДНК после воздействия циклами замораживания-оттаивания. Для данного анализа использовали исходный материал, содержащий $8,34 \times 10^{12}$ вг/мл AAV8-GFP в ФСБ с 0,001% плюроника F68 при pH 7,4. Образцы, содержащие различные титры AAV, готовили с использованием указанного исходного материала. Исходный материал концентрировали с использованием центрифужного фильтра Amicon для достижения желаемой целевой концентрации (более высокой концентрации), такой как титры 2X (концентрирование в 2 раза), 4X и 10X. Цикл замораживания-оттаивания выполняли путем замораживания образца, содержащего векторы AAV, при температуре -80°C в течение одного часа или дольше с последующим оттаиванием при комнатной температуре в течение 0,5 часа или дольше. Если не указано иное, для воздействия на образцы выполняли восемь циклов замораживания-оттаивания.

Образцы AAV8-GFP, на которые выполнили воздействие восемью циклами

замораживания-оттаивания, загружали в колонку ЭХР, включая исходный материал (AAV8.GFP на фиг. 5) и образцы с различными титрами, такими как титры в 2X, 4X и 10X, как показано на хроматограммах ЭХР на фиг. 5. Фракции, проходящие через колонку ЭХР, мониторировали с помощью спектрофотометра для измерения абсорбции фракций ЭХР при 280 нм. На фиг. 5 ось Y отображает нормализованную абсорбцию при 280 нм (УФ), а ось X выражена как время удержания фракций, проходящих через колонку ЭХР. Как показано на фиг. 5, во фракциях ЭХР, в профиле элюирования ЭХР, наблюдался один главный пик, соответствующий вирусным частицам AAV8-GFP, со временем удержания от 12 до 15 минут. Данный главный пик имеет значительную абсорбцию при 280 нм, обнаруженную с помощью спектрофотометра. Наблюдался один небольшой пик, имеющий абсорбцию при 280 нм, со временем удержания от 8 до 11 минут, обозначенный как пик 1 на фиг. 5, в профиле элюирования ЭХР.

Размер пика 1 в профиле элюирования ЭХР значительно увеличился после восьми циклов замораживания-оттаивания образцов AAV8-GFP. Увеличение размера пика 1 зависело от концентрации AAV8-GFP, например, титра AAV. В таблице 2 показаны вариации размера пика 1 до и после воздействия восемью циклами замораживания-оттаивания в профиле элюирования ЭХР. Данные результаты показали, что размер пика 1 значительно увеличился после воздействия замораживанием-оттаиванием, что указывало на высвобождение оцДНК-геномов AAV из вирусного капсида после воздействия замораживанием-оттаиванием. Кроме того, пик 1 и главный пик фракций ЭХР анализировали с помощью спектрофотометра для измерения коэффициента абсорбции при УФ 260/280 нм для оценки чистоты нуклеиновых кислот. Как показано в таблице 3, пик 1 фракций ЭХР продемонстрировал значение 2,1 при УФ 260/280 нм, что указывает на высокую чистоту ДНК с минимальным содержанием белка. Главный пик фракций ЭХР продемонстрировал значение 1,4 для УФ 260/280 нм, что указывает на присутствие белков. УФ-визуализация ЛС-массы показала значение 1,3 для УФ при 260/280 нм, соответствующее вирусным частицам.

В дополнение к этому применяли динамическое рассеяние света (ДРС) для определения в образцах профиля распределения сферы по размерам для вектора AAV. В таблице 4 показан гидродинамический радиус (в нм) вектора AAV до и после воздействия восемью циклами замораживания-оттаивания (З/О), определенный с помощью ДРС.

Таблица 2. Вариации размера пика 1 до и после воздействия замораживанием-оттаиванием

Вариации размера пика 1 во фракциях ЭХР			
Титр	% пика 1 до	% пика 1 после	% пика 1 количество (мг)
Источник	7,8%	27,9%	0,008
2x	6,8%	11,0%	0,011
4x	6,8%	10,7%	0,013
10x	4,8%	8,5%	0,049

Таблица 3. Коэффициенты абсорбции фракций ЭХР при УФ 260/280 нм.

Образцы	УФ 260/280 нм
ЭХР, пик 1	2,1
ЭХР, главный пик	1,4
УФ-визуализация ЛС-массы	1,3

Таблица 4. Гидродинамический радиус вектора AAV

Гидродинамический радиус (нм) по результатам ДРС		
Титр	До 8-кратн. З/О	После 8-кратн. З/О
Источник	13,1	13,4
2х	13,1	12,6
4х	13,0	12,3
10х	13,2	12,7

Высвобождение оцДНК из капсидов вируса AAV после воздействия замораживанием-оттаиванием характеризовали и определяли количественно с использованием флуоресцентного красителя, специально связывающегося с оцДНК. Флуоресцентный краситель добавляли к образцам AAV8-GFP после воздействия замораживанием-оттаиванием (З/О). Образцы, содержащие различные концентрации синтетического олигонуклеотида, готовили в качестве стандартов для получения стандартной кривой. Стандартную кривую получали путем смешивания 25 мкл стандартного раствора оцДНК с 25 мкл 1х раствора красителя для получения оцДНК в диапазоне концентраций от 10 нг/мл до 1000 нг/мл. Стандарты анализировали для обнаружения флуоресценции при возбуждении при 480 нм и излучении при 520 нм для образца объемом 50 мкл в 384-луночных планшетах.

В образцах AAV8-GFP, на которые воздействовали многократными циклами замораживания-оттаивания, например, пятью циклами замораживания-оттаивания (5-кратн. З/О) или десятью циклами замораживания-оттаивания (10-кратн. З/О), или горизонтальным встряхиванием в течение 48 часов, количественно определяли концентрации оцДНК. На фиг. 6 показано количественное определение концентраций оцДНК в образцах AAV8-GFP после воздействия замораживанием-оттаиванием и 48-часовым встряхиванием. Количества оцДНК в образцах AAV8-GFP увеличилось после воздействия замораживанием-оттаиванием и встряхиванием, как показано на фиг. 6. Ось Y на фиг. 6 отображает концентрации оцДНК в нг/мл.

Для дальнейшей оценки влияния циклов замораживания-оттаивания на утечку оцДНК применяли ЭХР-СВЭЖХ для измерения изменений в уровнях размерных вариантов в образцах AAV8.GFP вследствие стресса замораживания-оттаивания. Профиль элюирования ЭХР-СВЭЖХ образца AAV8.GFP без воздействия на него, в момент времени $t=0$, продемонстрировал главный пик времени удержания около 7,9 минут, с ранним пиком элюирования через около 6,3 минут, обозначаемым в данном документе как пик 1, как показано на фиг. 7. Интересно, что площадь пика 1 и его высота увеличились

после десяти циклов замораживания-оттаивания. Поскольку пик 1 элюировался раньше, чем главный пик в профиле ЭХР-СВЭЖХ, возможным объяснением этого является то, что пик, наблюдающийся около 6,3 минут, приходится на высокомолекулярные соединения, такие как агрегаты капсидов AAV.

Для дальнейшей характеристики соединений пика 1 анализировали УФ-сигналы, собранные при 260 нм и 280 нм с хроматограммы ЭХР-СВЭЖХ образцов AAV8.GFP. В целом, образцы с коэффициентом $УФ_{260/280}$, равным 0,6, считаются «чистым» белком, а образцы с коэффициентом $УФ_{260/280}$, равным 1,8, считаются «чистой» ДНК (Wilfinger et al., *Biotechniques* 22 (3) (1997) 474-481; Porterfield and Zlotnick, *Virology* 407 (2) (2010) 281-288). Для образцов AAV8, проанализированных с помощью ЭХР-СВЭЖХ, коэффициент $УФ_{260/280}$ для пика 1 составил 1,8, а коэффициент $УФ_{260/280}$ для главного пика составил 1,2 (таблица 5). Коэффициент $УФ_{260/280}$, наблюдаемый для главного пика, указывает на вклад абсорбции УФ как от белка, так и от ДНК, что согласуется с главным пиком, представляющим капсид AAV, инкапсулирующий в себе оцДНК-геном. Коэффициент $УФ_{260/280}$, наблюдаемый для пика 1, предполагает скорее наличие примеси ДНК, чем агрегатов AAV, которые вместо этого имели бы более низкий коэффициент $УФ_{260/280}$ вследствие вклада абсорбции белка при 280 нм.

Таблица 5. Коэффициент $УФ_{260/280}$ предварительного пика и главного пика на хроматограмме ЭХР-СВЭЖХ AAV8.GFP

	УФ 260/280, предварительный пик	УФ 260/280, главный пик
AAV8, t=0	1,8	1,2
AAV8, 10-кратн. З/О	1,9	1,1

Чтобы подтвердить идентификационные характеристики данного пика примесей проводили дополнительную характеристику с использованием ЭХР-ВЭЖХ, подключенной к детектору флуоресценции (ЭХР-ВЭЖХ-ДФ, англ. «SE-HPLC-FLR»), обработки нуклеазой и секвенирования нового поколения (СНП). Сначала к системе жидкостной хроматографии подключали детектор флуоресценции и регистрировали сигнал флуоресценции при возбуждении при 280 нм и излучении при 350 нм. С помощью флуоресцентного детектора наблюдался только главный пик, а пик 1, видимый на УФ-хроматограмме, отсутствовал. Это наблюдение дополнительно подтвердило состав пика примесей как ДНК, а не как белоксодержащих веществ. Затем применяли бензоназу для обработки образцов AAV8.GFP. Бензоназа хорошо известна как ДНК-нуклеаза и широко используется для расщепления ДНК в образцах для различных целей (Sastry et al., *Human Gene Therapy* 15 (2) (2004) 221-226; Antonioli et al., *Journal of Chromatography A* 1216 (17) (2009) 3606-3612; Konz et al., *Biotechnology Progress* 21 (2) (2005) 466-472). Как показано на фиг. 8, интенсивность пика 1 в момент времени около 6,3 минут значительно снизилась (приблизительно до базового уровня) с одновременным снижением высоты главного пика. Эти данные указывают на то, что пик примесей, который элюировался перед главным в ЭХР-СВЭЖХ, действительно представлял собой ДНК.

Чтобы определить идентификационные характеристики пика 1 на молекулярном уровне, его избирательно обогащали для СНП-анализа с использованием платформы Illumina путем сбора фракций, элюированных с 5,8 по 7,2 минут, и 5-кратного концентрирования полученных объединенных фракций (таблица 6). Концентрированный пул использовали для подготовки СНП-библиотеки в соответствии с протоколом Lecomte et al. для секвенирования одноцепочечной вирусной ДНК (англ. «SSV-Seq») (Lecomte et al., Adeno-Associated Virus Vectors, Springer 2019, pp. 85-106). Протокол «SSV-Seq» состоит из четырех экспериментальных этапов: (этап 1) извлечение ДНК из пула AAV; (этап 2) синтез ДНК второй цепи; (этап 3) подготовка библиотеки секвенирования Illumina; и (этап 4) высокопроизводительное секвенирование на основе платформы Illumina. Анализ данных выполняли с использованием собственного специализированного конвейера биоинформатики. «SSV-Seq» представляет собой не зависящую от последовательности методику (в отличие, например, от кПЦР), поскольку она может обнаруживать и идентифицировать молекулы ДНК без каких-либо предварительных знаний (например, необходимых для генерации праймеров).

Таблица 6. Результаты СНП для обогащенного предварительного пика в хроматограмме ЭХР-СВЭЖХ AAV8.GFP

Повторность №	Общее число первичных считываний	Общее число отфильтрованных, картированных считываний	Наименование референса	Считывания, картированные по референсу	% картированных считываний
Повторность 1	18410428	17716518			
			pAdHelper_VVT	69904	0,61
			Rep-Cap8_VVT	129735	1,13
			CAG-eGFP	11158267	96,98
			CAG-eGFP-остов	148288	1,29
Повторность 2	18526989	17876959	Ad5_E1AB	0	
			pAdHelper_VVT	69957	0,59
			Rep-Cap8_VVT	126958	1,07
			CAG-eGFP	11534278	97,12
Повторность 3	18835821	18179263	CAG-eGFP-остов	145542	1,23
			Ad5_E1AB	0	
			pAdHelper_VVT	71006	0,59
			Rep-Cap8_VVT	130130	1,08
			CAG-eGFP	11672300	97,09
			CAG-eGFP-остов	148659	1,24
			Ad5_E1AB	0	

Учитывая, что обработка бензоназой устраняла пик примесей, выделение ДНК проводили без какой-либо обработки ДНКазой. Считывания классифицировали к каждой из следующих референсных последовательностей: (i) ITR, содержащий геном CAG-eGFP bGFP; (ii) бактериальный остов векторной плазмиды; (iii) вся плазида Rep-Cap8; (iv) вся хелперная плазида; (v) фрагменты генома Ad5, интегрированные в геном

упаковочной клеточной линии HEK293; и (vi) геном человека, первичная сборка генома GRCh38.

Подавляющее большинство считываний из СНП картировались с геномом CAG-eGFP (~97%), за которым следует меньшее количество, соответствующее остову векторной плазмиды (~1,2%), Rep-Cap8 (~1-1,1%) и хелперной плазмиде (0,6%). Никакие из считываний не картировались с геномом человека. Эти наблюдения положительно идентифицировали примесь ДНК как геном вектора AAV.

Для количественного определения абсолютного количества свободной ДНК в образцах AAV применяли общепризнанный анализ Quant-iT ssDNA. В данном анализе к исследуемым образцам добавляли внешний флуоресцентный краситель для усиления флуоресцентного сигнала оцДНК при возбуждении. Получали стандартную кривую с различными концентрациями олигонуклеотидов, которую использовали для расчета концентрации ДНК в образцах с неизвестной концентрацией. Как показано на фиг. 9, анализ-детекция Quant-iT ssDNA показал увеличение абсолютного количества свободной оцДНК в образцах AAV8.GFP в 3,6 раза - от 364 нг/мл до 1303 нг/мл в основном составе (1x ДФСБ, 0,001% плуроник F68) после десяти циклов замораживания-оттаивания. Контрольный образец AAV8.GFP в основном составе, нагреваемый при 95°C в течение 10 минут, содержал 34000 нг/мл оцДНК. Предполагая, что при термической обработке при температуре 95°C высвобождается 100% инкапсулированной оцДНК, эти данные указывают на то, что концентрация свободной оцДНК увеличилась с около 1% до около 4% от общей инкапсулированной оцДНК в образце AAV8.GFP после десяти циклов замораживания-оттаивания. Недавно Bee et al. сообщили об увеличении количества свободной ДНК в их образцах AAV8-X после циклов замораживания-оттаивания на основании определения похожим способом на основе красителя (Bee et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, 2021). В буфере ДФСБ плюс полоксамер 188 наблюдалось повышение свободной ДНК на $0,38\% \pm 0,08\%$ на каждый цикл замораживания-оттаивания. Они наблюдали около 1% свободной ДНК в исходном образце и около 3% свободной ДНК после 5 циклов замораживания-оттаивания, что согласуется с данными авторов данного изобретения, представленными в данном документе. Подводя итог, связанная с продуктом примесь, представляющая собой предварительный пик - пик 1 в профиле ЭХР-СВЭЖХ, представляла собой оцДНК, вытекшую из капсидов AAV.

Пример 3. Утечка оцДНК в других серотипах AAV

Чтобы определить, является ли утечка оцДНК уникальной для AAV8.GFP, вышеуказанный анализ применяли к группе различных серотипов AAV: AAV2, AAV3b, AAV5, AAV7 и AAVDJ. Все образцы доводили до того же титра, что и образцы AAV8, в том же основном составе. Затем данные образцы подвергали десяти циклам замораживания-оттаивания и анализировали с помощью анализа Quant-iT и ЭХР-СВЭЖХ. Как показано на фиг. 10, все протестированные серотипы AAV изначально продемонстрировали очень низкие уровни свободной ДНК. После десяти циклов замораживания-оттаивания во всех образцах, за исключением AAV2, наблюдали

значительное повышение УФ-сигнала (ЭХР-СВЭЖХ) и флуоресцентного сигнала (анализ Quant-iT) для примесей пика 1. Хотя абсолютное количество общей оцДНК, вытекшей из-за замораживания-оттаивания, было различным в разных образцах, утечка оцДНК была обнаружена для всех серотипов AAV, за исключением AAV2. Данный результат свидетельствует о том, что механизм высвобождения оцДНК из капсида AAV8 из-за стресса замораживания-оттаивания применим к другим серотипам.

У разных серотипов AAV основное различие в последовательностях капсидных белков заключается в гипервариабельных участках поверхности, которые позволяют им связываться с разными типами клеток с разной эффективностью (Snyder and Moullier, Adeno-associated virus: methods and protocols, Springer, 2011). Репликационные и структурные гены, ответственные за капсидные белки, как правило, высококонсервативны у разных серотипов, что потенциально делает их одинаково восприимчивыми к стрессу замораживания-оттаивания. Следовательно, влияние эксципиентов на стабильность AAV во время замораживания-оттаивания может быть распространено на каждый из данных серотипов AAV.

Пример 4. Скрининг эксципиентов для уменьшения утечки ДНК

Поскольку целостность и успешная доставка оцДНК, заключенной в оболочку, имеет решающее значение для генной терапии на основе AAV, крайне важно свести к минимуму утечку оцДНК из капсидов AAV в различных условиях, включительно со стрессом замораживания-оттаивания. Добавление белок-стабилизирующих эксципиентов в составы AAV может способствовать стабильности AAV при воздействии стресса замораживания-оттаивания, а также может способствовать пониманию механизма утечки оцДНК. Поэтому были разработаны составы, включающие в себя белок-стабилизирующие эксципиенты, чтобы проверить, можно ли за счет стабилизации капсидных белков уменьшить утечку оцДНК во время циклов замораживания-оттаивания. В качестве основного состава был выбран буфер ДФСБ, поскольку он широко используется для AAV благодаря его соответствию физиологическим условиям. Несколько распространенных категорий эксципиентов, включая полиолы (сахарозу, трегалозу, маннит, глицерол, пропиленгликоль и полиэтиленгликоль), аминокислоты (пролин) и поверхностно-активные вещества (Плюроник™ F68 (полосамер 188)), были выбраны для оценки их способности защищать стабильность белка (например, целостность капсида AAV) от стресса замораживания-оттаивания, тем самым потенциально уменьшая утечку оцДНК.

Результаты анализа свободной ДНК на основе флуоресценции и анализа способом ЭХР-СВЭЖХ показали, что по сравнению с основным составом (основа) данные разработанные составы продемонстрировали уменьшенную утечку оцДНК даже после десяти циклов замораживания-оттаивания, как показано на фиг. 9. Например, добавление 5% сахарозы или 5% трегалозы уменьшает утечку оцДНК с 4-кратного увеличения до меньше чем 2-кратного увеличения, как выявлено с помощью ЭХР-СВЭЖХ, как показано на фиг. 9А и в таблице 7. Добавление 5% сахарозы или 5% трегалозы уменьшило утечку оцДНК с 3,6-кратного увеличения до меньше чем 50%, как выявлено с помощью анализа

флуоресцентной свободной ДНК, как показано на фиг. 9В и в таблице 8. Однако 5%-й маннит был не так эффективен в уменьшении утечки оцДНК, как сахароза и трегалоза. Подобно сахарозе и трегалозе, 5% глицерола, 5% пропиленгликоля или 5% полиэтиленгликоля 400 (ПЭГ 400) уменьшали утечку оцДНК с 4-кратного увеличения до меньше чем 50%, как выявлено с помощью ЭХР-СВЭЖХ, и с 3,6-кратного увеличения до ~50% увеличения, как выявлено с помощью флуоресцентного анализа свободной ДНК. Добавление 0,1% плюроника F68 - поверхностно-активного вещества, часто используемого в составе продукта AAV, - продемонстрировало способность защищать AAV от утечки оцДНК, сопоставимую таковой у сахарозы и трегалозы. Пролин, как аминокислотный криопротектор, также продемонстрировал значительный защитный эффект от утечки оцДНК на основании результатов анализа флуоресценции свободной оцДНК и анализа ЭХР-СВЭЖХ. В дополнение к этому, гидродинамический радиус вирусных частиц в образцах анализировали с помощью ДРС, как показано на фиг. 11 и в таблице 9.

Таблица 7. Характеризация примесей ДНК в образцах AAV8-GFP с использованием ЭХР

Результаты ЭХР	t0 (%)	10-кратн. З/О (%)
F1 Основание	6,05	24,48
F2 Сахароза, 5%	6,61	10,16
F3 Трегалоза, 5%	5,76	10,27
F4 Маннит, 5%	6,44	19,81
F5 Пролин, 2,5%	5,36	13,16
F6 Глицерол, 5%	6,66	6,91
F7 F68, 0,1%	2,72	9,21
F8 ПГ, 5%	4,19	5,94

Таблица 8. Количественное определение примесей ДНК в образцах AAV8-GFP с использованием метки - флуоресцентного красителя

оцДНК (флуоресценция)	t0 (нг/мл)	10-кратн. З/О (нг/мл)
F1 Основание	363,9	1302,9
F2 Сахароза, 5%	363,2	520,8
F3 Трегалоза, 5%	395,9	565,8
F4 Маннит, 5%	399,8	917,0
F5 Пролин, 2,5%	392,1	490,6
F6 Глицерол, 5%	407,2	356,2
F7 F68, 0,1%	383,3	451,8
F8 ПГ, 5%	408,9	401,1
Денатурированный стандарт	н/п	10246,6

Таблица 9. Анализ гидродинамического радиуса вирусных частиц в образцах AAV8-GFP с использованием ДРС

ДРС	t0	10-кратн. З/О
F1 Основание	13,1	12,4
F2 Сахароза, 5%	9,1	7,7
F3 Трегалоза, 5%	7,4	8,5
F4 Маннит, 5%	11,3	10
F5 Пролин, 2,5%	12,5	11,7
F6 Глицерол, 5%	13,4	12,8
F7 F68, 0,1%	11,2	11,1
F8 ПГ, 5%	14,7	14

Было обнаружено, что несколько эксципиентов эффективны в минимизации утечки оцДНК из капсидов AAV после воздействия циклов замораживания-оттаивания. Эксципиенты, которые смогли эффективно уменьшить утечку оцДНК во время тестирования, включали в себя сахарозу, трегалозу, маннит, пролин, глицерин, плуроник F68 и пропиленгликоль. Основываясь на данных результатах, для дальнейших анализов были выбраны сахароза, пропиленгликоль и плуроник F68. Составы с различными концентрациями сахарозы (2,5%, 5% и 10%), пропиленгликоля (2,5%, 5% и 10%) и плуроника F68 (0,001%, 0,01% и 0,1%) отбирали для анализа после 1, 2 или 4 циклов замораживания-оттаивания, что отражает репрезентативное число циклов замораживания-оттаивания при разработке, производстве и применении лекарственного (-ых) продукта (-ов) AAV. Как показано на фиг. 12, наблюдалось увеличение утечки оцДНК по мере того, как к AAV в F1 применялось больше циклов замораживания-оттаивания. После четырех циклов замораживания-оттаивания как сахароза, так и пропиленгликоль продемонстрировали значительную и сопоставимую защиту от утечки оцДНК в трех протестированных концентрациях (2,5%, 5% и 10%). Несколько меньшая утечка оцДНК наблюдалась при более высоких концентрациях сахарозы и пропиленгликоля. Плуроник F68 был менее эффективным в предотвращении утечки оцДНК, чем сахароза и пропиленгликоль. Тем не менее, увеличение концентрации плуроника F68 все больше снижало утечку оцДНК.

Криопротекторы и поверхностно-активные вещества, как правило, используются вместе в биологических препаратах для обеспечения защиты от различных типов стрессов. Чтобы проверить эффект комбинированных эксципиентов против стресса при замораживании-оттаивании и проверить, уменьшают ли белок-стабилизирующие эксципиенты утечку оцДНК у других серотипов, разрабатывали и оценивали составы как с сахарозой, так и с плуроником F68 с различными серотипами AAV.

На фиг. 13 основным составом (ОснС) былДФСБ, в то время как оптимизированный состав (ОптС) содержал 10% сахарозы и 0,1% плуроника F68 вДФСБ.

Оптимизированный состав значительным образом ингибировал утечку оцДНК для AAV3b, AAV5, AAV7, AAV8 и AAVDJ после 10 циклов замораживания-оттаивания по сравнению с основным составом без сахарозы и плуроника F68. По результатам анализа свободной ДНК на основе флуоресценции уменьшение утечки оцДНК составило от 10 до 20 раз; по результатам ЭХР-СВЭЖХ уменьшение площади пика примеси оцДНК составило от 3 до 10 раз, при этом для AAVDJ наблюдалось 40-кратное уменьшение. Интересно, что защитный эффект был незначительным для AAV2, вероятно, потому, что утечка свободной ДНК без криопротектора и поверхностно-активного вещества была незначительной по сравнению с другими серотипами. Основываясь на данных результатах, оптимизированный состав с криопротектором и поверхностно-активным веществом мог бы защитить различные серотипы AAV от стресса, вызванного замораживанием-оттаиванием.

Экципиенты выбираются на основе их свойств и установленного механизма стабилизации белка. Сахароза и трегалоза, как подтипы полиола, являются одними из наиболее часто используемых эксципиентов на основе сахара для стабилизации белков (Singh, *Challenges in Protein Product Development*, Springer, 2018, pp. 63-95). Глицерин, пропиленгликоль и полиэтиленгликоль (ПЭГ 400 для данных экспериментов) также являются обычными полиоловыми криопротекторами для белковых молекул. Криопротекторы действуют посредством различных механизмов, включающих в себя преимущественное удаление с поверхности белка, формирование стекловидной матрицы вокруг белковых молекул или образование водородных связей с белками (Timasheff, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 22 (1) (1993) 67-97; Corradini et al., *Scientific Reports* 3 (1) (2013) 1-10; Markarian et al., *Cryobiology* 49 (1) (2004) 1-9). Плуроник F68 добавляют в составы AAV в качестве поверхностно-активного вещества, защищающего от механического стресса во время производства и транспортировки, а также от межфазного стресса во время циклов замораживания-оттаивания, и, как правило, его используют в белковых фармацевтических препаратах для этих целей (Nail and Akers, *Development and manufacture of protein pharmaceuticals*, Springer Science & Business Media, 2012). Плуроник F68, как неионное поверхностно-активное вещество, может снижать поверхностное натяжение на границе раздела, создаваемое механическими воздействиями и циклами замораживания-оттаивания, и, следовательно, ингибировать адсорбцию белка на границе раздела вследствие конкуренции с данным поверхностно-активным веществом (Kasimbeg et al., *Journal of Pharmaceutical Sciences* 108 (1) (2019) 155-161; Khan et al., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 97 (2015) 60-67; Dixit et al., *Pharmaceutical Research* 30 (7) (2013) 1848-1859). Учитывая роль данных эксципиентов в стабилизации структуры белка и поддержании стабильности, данные результаты также подтверждают объяснение механизма утечки оцДНК из капсидов AAV.

В данных исследованиях стабильности наблюдался повышенный уровень свободной оцДНК в растворах AAV после циклов замораживания-оттаивания. В то время как свободная оцДНК в лекарственной массе до воздействия замораживания-оттаивания

могла представлять собой остаточную ДНК, перенесенную из клеточной культуры или из этапа очистки, повышенный уровень оцДНК после многократных циклов замораживания-оттаивания представляет собой геномную оцДНК, которая, как было показано, вытекла из капсидов AAV. Это подтверждается результатами характеристики с помощью СНП и согласуется с наблюдением того, что белок-стабилизирующие эксципиенты ингибировали утечку оцДНК после стресса замораживания-оттаивания. Произошла ли утечка оцДНК в результате выброса генома (т. е. при неповрежденном капсиде) или в результате разборки капсидов AAV, дополнительно обсуждается ниже.

AAV8 и AAV9 были исследованы на уровне отдельного вирусного капсида, чтобы изучить механизм деградации при термическом стрессе, таком как инкубация при температуре от 50 до 80°C (Bernaud et al., *Journal of Biological Physics* 44 (2) (2018) 181-194). Заключенный в оболочку геном ДНК выбрасывался из неповрежденного или частично развернутого капсида, что визуализировали с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ). Гипотетически, если выброс является основным механизмом утечки оцДНК, титр полного капсида должен уменьшаться с одновременным увеличением титра пустого капсида, а сумма полных и пустых капсидов должна оставаться постоянной до и после стресса. В качестве альтернативы, если утечка оцДНК происходит в результате разборки AAV (т. е. разрыва капсида), общий титр капсида должен уменьшиться после стресса из-за уменьшения титра полного капсида (титр пустого капсида должен оставаться неизменным). Поскольку свободная оцДНК составляла ~1% от общего количества оцДНК в оболочке в образцах AAV, на которые не воздействовали, и повысилась до ~5% после 10 циклов замораживания-оттаивания, изменение титра (-ов) полного/пустого капсида должно быть на аналогичном уровне величины.

К сожалению, при типичном коэффициенте вариации 10-20% (CV%) в твердофазном иммуноферментном анализе (ТИФА) титра капсидов трудно определить, происходит ли сопутствующее изменение титра капсидов на 1-5% при изменении содержания свободных оцДНК на 1-5%. Анализ ЭХР-СВЭЖХ при 260 и 280 нм также не дал убедительных результатов в определении механизма деградации из-за вариаций, присущих данному способу, и пределов приближений и оценок (например, коэффициента экстинкции и молекулярной массы оцДНК, и капсидного белка и длины пути проточной ячейки в УФ-детекторе). Динамическое рассеяние света (ДРС) применяли для мониторинга размерных вариантов в качестве способа - альтернативы способу ЭХР-СВЭЖХ, и не было обнаружено явной агрегации или фрагментации AAV. Тщательное изучение профиля элюирования ЭХР-СВЭЖХ также не выявило каких-либо очевидных пиков белка VP после капсидов AAV. Подводя итог, вариабельности, присущие способам ДРС и ЭХР-СВЭЖХ (возможно, также ТИФА) помешали окончательному выяснению механизма утечки оцДНК из AAV. Возможно, потребуется дальнейшее исследование с использованием более точного (-ых) способа (-ов) определения титра, чтобы лучше понять механизм утечки оцДНК. Как отмечалось ранее, инструменты визуализации, такие как АСМ, также могут предоставить представление о целостности капсида после циклов

замораживания-оттаивания и способствовать пониманию механизмов.

Лекарственные продукты для генной терапии на основе AAV, как правило, проходят один или большее число циклов замораживания-оттаивания во время производства, транспортировки, хранения и введения. Данная характеристика AAV8 в буфере ДФСБ выявила, что часть заключенной в оболочку оцДНК вытекла из AAV8 даже после одного цикла замораживания-оттаивания. Происхождение вытекшей оцДНК подтвердили как геномное - геномная ДНК, изначально инкапсулированная в капсид. Степень утечки генома увеличивалась с увеличением числа циклов замораживания-оттаивания. Утечка генома также наблюдалась в различной степени у других протестированных серотипов, включительно с AAV2, AAV3b, AAV5, AAV7 и AAVDJ.

Исследования по скринингу составов идентифицировали эксципиенты, такие как полиолы, аминокислоты и поверхностно-активные вещества, которые эффективны в ингибировании утечки геномной ДНК из AAV. Дальнейшие исследования с сахарозой, пропиленгликолем и плуроником F68 привели к лучшему пониманию их влияния на стабильность AAV в отношении утечки оцДНК. Данные результаты дают представление об утечке оцДНК из AAV, при этом стресс от замораживания и оттаивания является одним из путей деградации. Кроме того, данные результаты представляют ценность для будущей разработки стабильной лекарственной субстанции AAV и составов лекарственных продуктов AAV.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ идентификации примесей нуклеиновых кислот в образце, содержащем векторы аденоассоциированного вируса (AAV), включающий в себя:

 приведение образца, содержащего векторы аденоассоциированного вируса (AAV), в контакт с колонкой эксклюзионной хроматографии по размеру (ЭХР);

 промывку указанной колонки ЭХР раствором для получения по меньшей мере одного элюента; и

 идентификацию примесей нуклеиновых кислот в указанном по меньшей мере одном элюенте с помощью спектрофотометра.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанные примеси нуклеиновых кислот представляют собой одноцепочечные ДНК - геномы AAV.

3. Способ по п. 1, дополнительно включающий в себя обработку указанных примесей нуклеиновых кислот флуоресцентным красителем.

4. Способ по п. 1, дополнительно включающий в себя измерение абсорбции указанного по меньшей мере одного элюента при 280 нм с помощью спектрофотометра.

5. Способ по п. 1, дополнительно включающий в себя измерение коэффициента абсорбции указанного по меньшей мере одного элюента при 260/280 нм с помощью спектрофотометра.

6. Способ по п. 1, дополнительно включающий в себя количественное определение примесей нуклеиновых кислот на основе стандартной кривой нуклеиновых кислот.

7. Способ по п. 1, дополнительно включающий в себя приведение указанного образца в контакт с ДНК-нуклеазой до приведения указанного образца в контакт с колонкой ЭХР.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная система ЭХР представляет собой систему эксклюзионной сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии по размеру (ЭХР-СВЭЖХ).

9. Способ по п. 1, дополнительно включающий в себя подвергание указанного по меньшей мере одного элюента секвенированию нового поколения (СНП).

10. Композиция, содержащая по меньшей мере один вектор аденоассоциированного вируса (AAV) и по меньшей мере один эксципиент, при этом указанный по меньшей мере один эксципиент представляет собой сахар, аминокислоту, поверхностно-активное вещество или полиол, при этом указанный по меньшей мере один вектор AAV содержит упакованные нуклеиновые кислоты; и при этом указанный по меньшей мере один вектор AAV в указанной композиции защищен от утечки указанных упакованных нуклеиновых кислот.

11. Композиция по п. 10, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один вектор AAV подвергнут по меньшей мере одному циклу замораживания-оттаивания.

12. Композиция по п. 10, отличающаяся тем, что указанные упакованные нуклеиновые кислоты представляют собой одноцепочечную ДНК из генома AAV, при этом указанные упакованные нуклеиновые кислоты присутствуют внутри капсида AAV.

13. Композиция по п. 10, отличающаяся тем, что указанный эксципиент присутствует в концентрации от около 0,001% до около 10%, при этом указанная композиция дополнительно содержит фосфатно-солевой буфер и неионное поверхностно-активное вещество.

14. Композиция по п. 10, отличающаяся тем, что указанный сахар представляет собой сахарозу, трегалозу, маннит, рафинозу, лактозу, глюкозу, мальтозу, мальтотриозу, мальтотетрозу, мальтопентозу или мальтогептозу.

15. Композиция по п. 10, отличающаяся тем, что указанная аминокислота представляет собой пролин.

16. Композиция по п. 10, отличающаяся тем, что указанное поверхностно-активное вещество представляет собой полоксамер 188.

17. Композиция по п. 10, отличающаяся тем, что указанное поверхностно-активное вещество представляет собой неионное поверхностно-активное вещество, при этом указанное поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации от около 0,001% до около 0,2%.

18. Композиция по п. 10, отличающаяся тем, что указанная композиция включает в себя сахарозу и полоксамер 188.

19. Композиция по п. 18, отличающаяся тем, что сахароза присутствует в концентрации от 2,5% до 10% и полоксамер 188 присутствует в концентрации от 0,001% до 0,2%.

20. Способ для защиты векторов аденоассоциированного вируса (AAV) от утечки упакованных нуклеиновых кислот, включающий в себя:

получение образца, включающего в себя по меньшей мере один вектор AAV; и
добавление к указанному образцу стабилизирующей композиции для образования защитного состава,

при этом указанный защитный состав защищает указанный по меньшей мере один вектор AAV от утечки упакованных нуклеиновых кислот, указанная стабилизирующая композиция содержит по меньшей мере один эксципиент и указанный эксципиент представляет собой сахар, аминокислоту, поверхностно-активное вещество или полиол.

21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что указанный вектор AAV подвергнут по меньшей мере одному циклу замораживания-оттаивания.

22. Способ по п. 20, отличающийся тем, что указанные упакованные нуклеиновые кислоты представляют собой одноцепочечные ДНК - геномы AAV, при этом указанные упакованные нуклеиновые кислоты присутствуют внутри капсида AAV.

23. Способ по п. 20, отличающийся тем, что указанный эксципиент присутствует в концентрации от около 0,001% до около 10% в указанном защитном составе, при этом указанная стабилизирующая композиция дополнительно содержит фосфатно-солевой буфер и неионное поверхностно-активное вещество.

24. Способ по п. 20, отличающийся тем, что указанный сахар представляет собой сахарозу, трегалозу, маннит, рафинозу, лактозу, глюкозу, мальтозу, мальтотриозу, мальтотетрозу, мальтопентозу или мальтогептозу.

25. Способ по п. 20, отличающийся тем, что указанная аминокислота представляет собой пролин.

26. Способ по п. 20, отличающийся тем, что указанное поверхностно-активное вещество представляет собой полксамер 188.

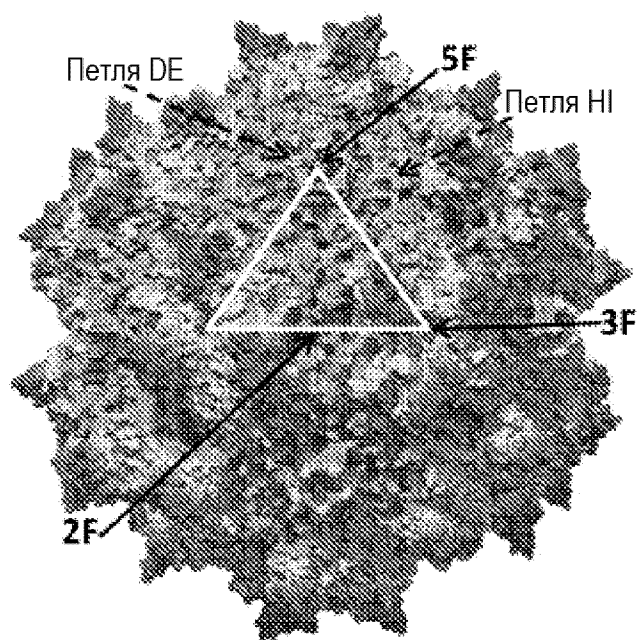
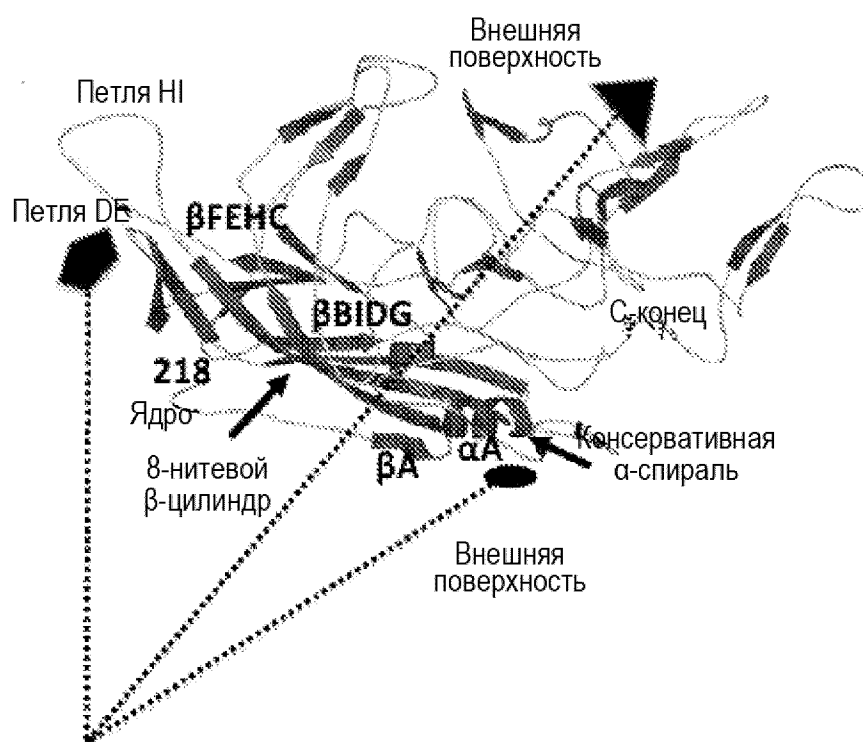
27. Способ по п. 20, отличающийся тем, что указанное поверхностно-активное вещество представляет собой неионное поверхностно-активное вещество, при этом указанное поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации от около 0,001% до около 0,2% в указанном защитном составе.

28. Способ по п. 20, отличающийся тем, что указанная стабилизирующая композиция включает в себя сахарозу и полксамер 188.

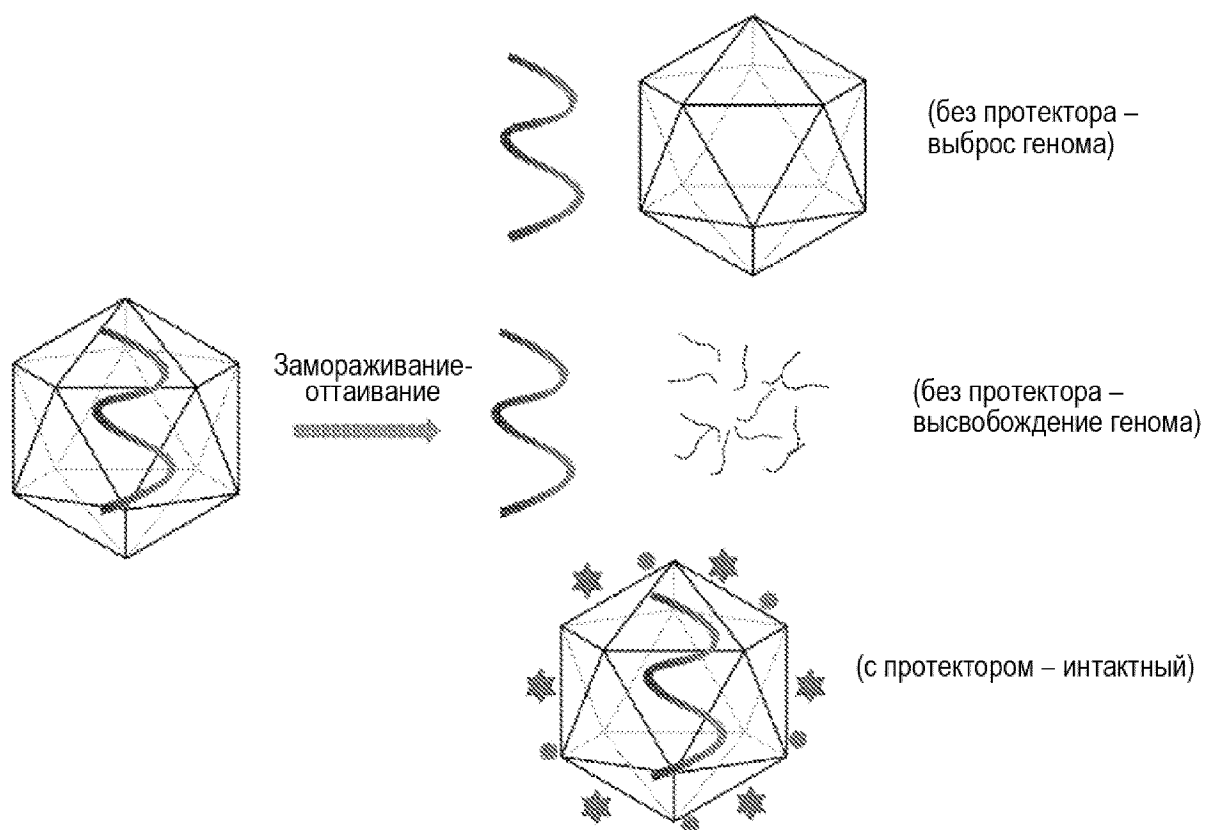
29. Способ по п. 28, отличающийся тем, что сахароза присутствует в концентрации от 2,5% до 10% в указанном защитном составе и полксамер 188 присутствует в концентрации от 0,001% до 0,2% в указанном защитном составе.

По доверенности

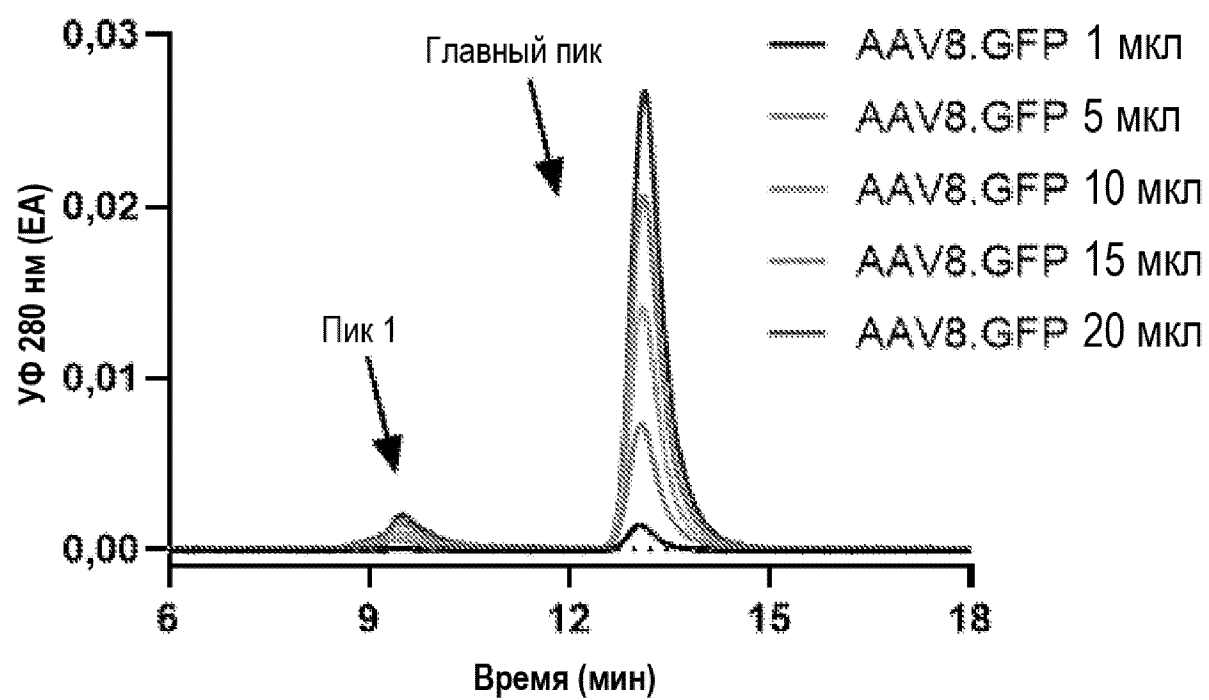
Фиг. 1



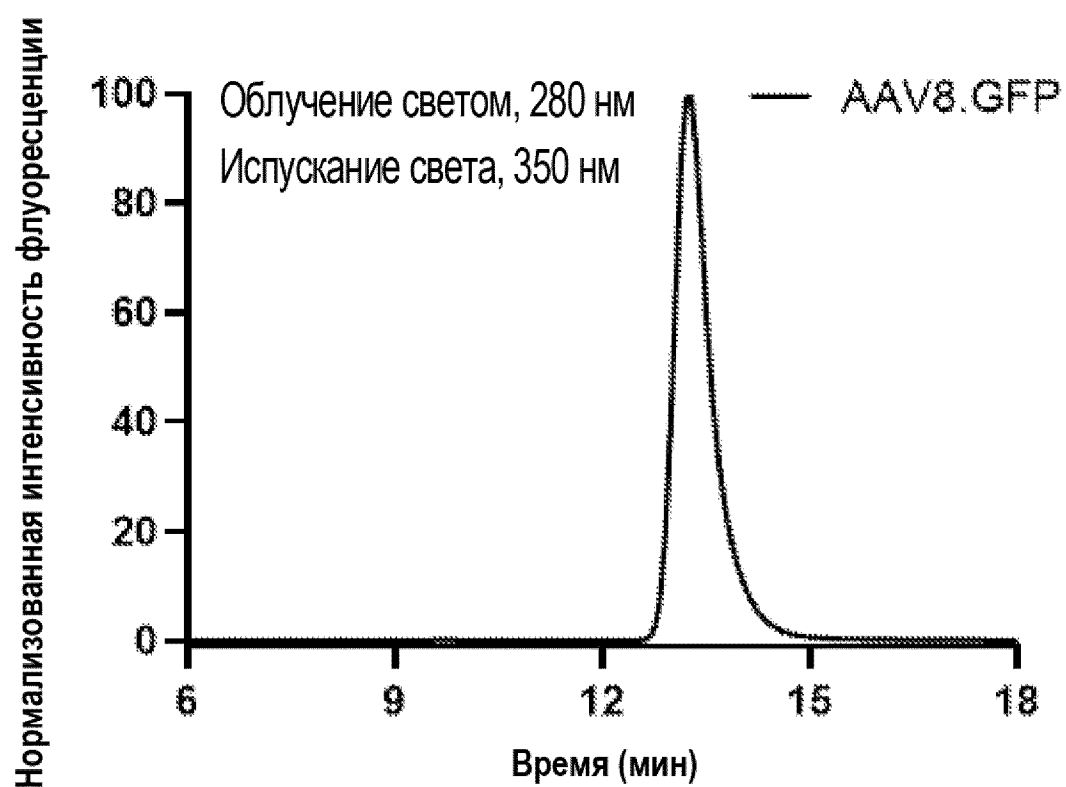
Фиг. 2



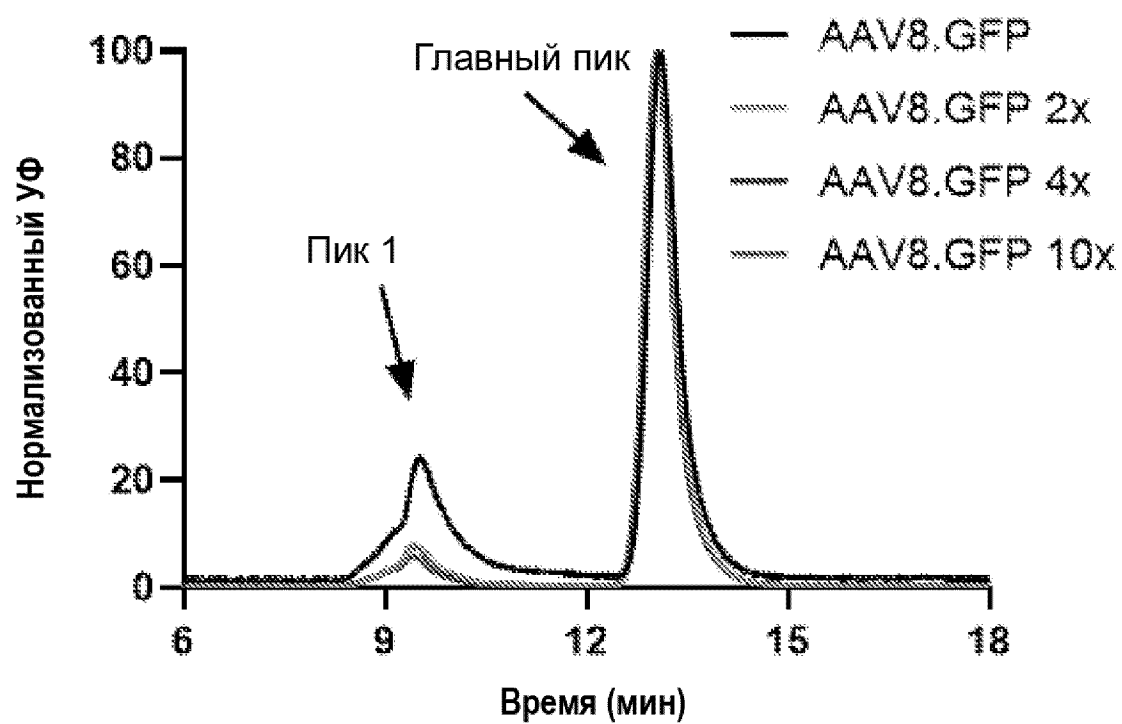
Фиг. 3



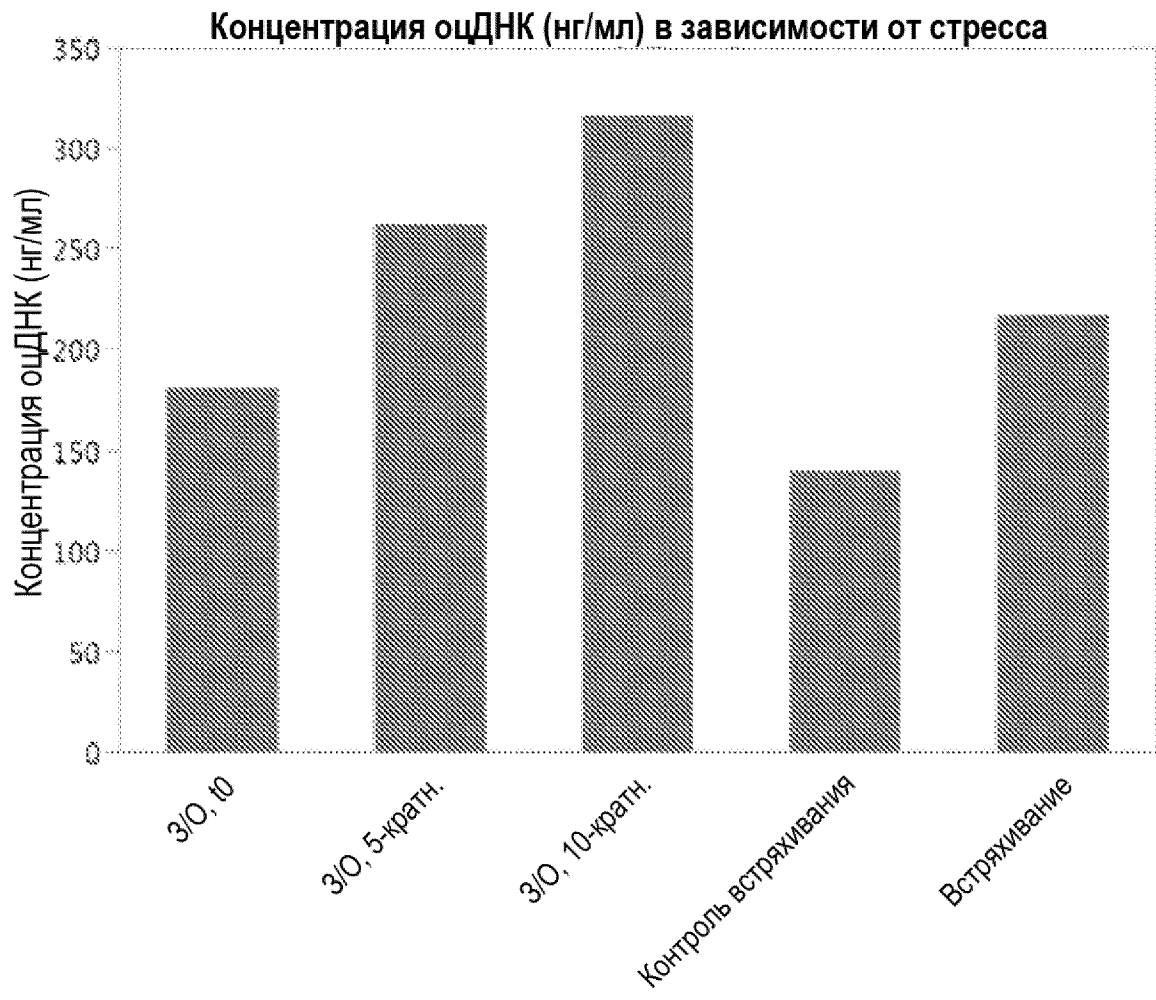
Фиг. 4



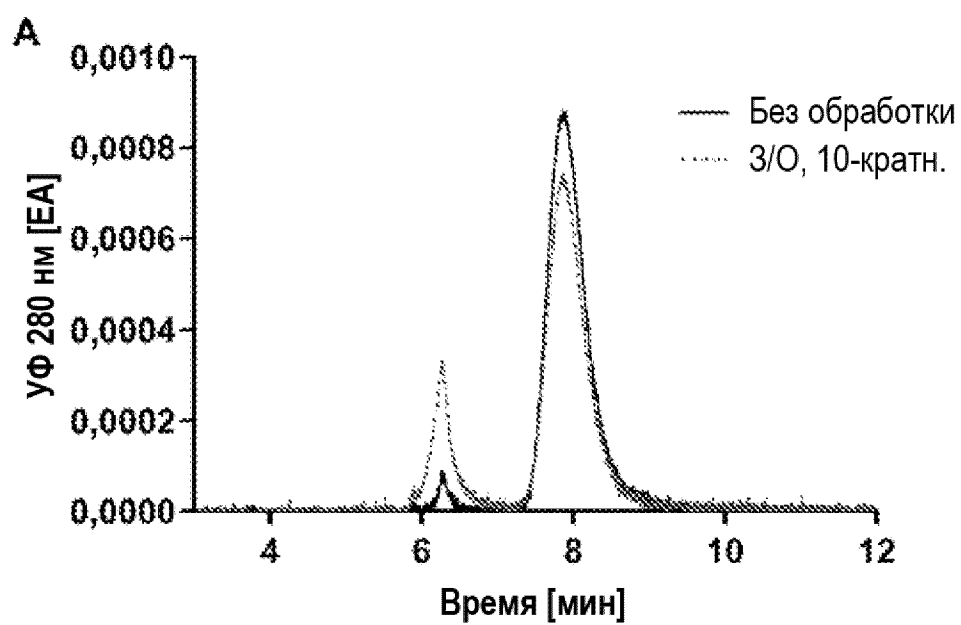
Фиг. 5



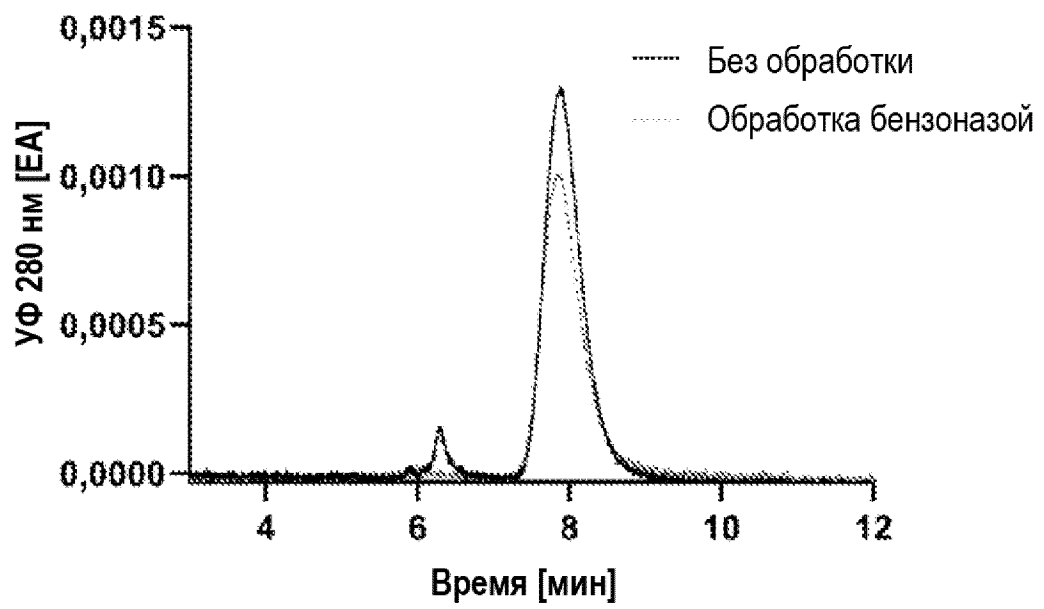
Фиг. 6



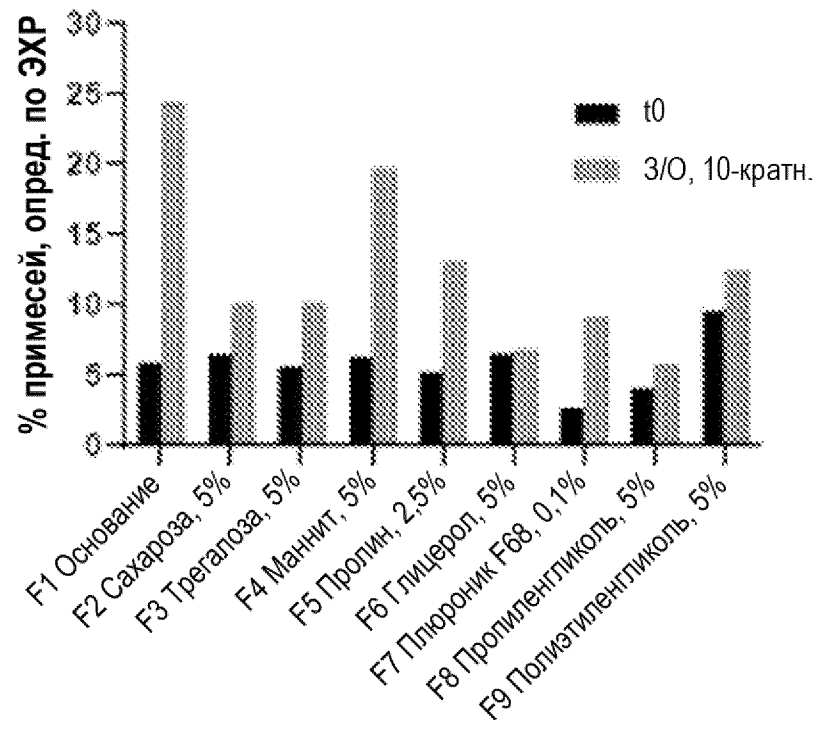
Фиг. 7



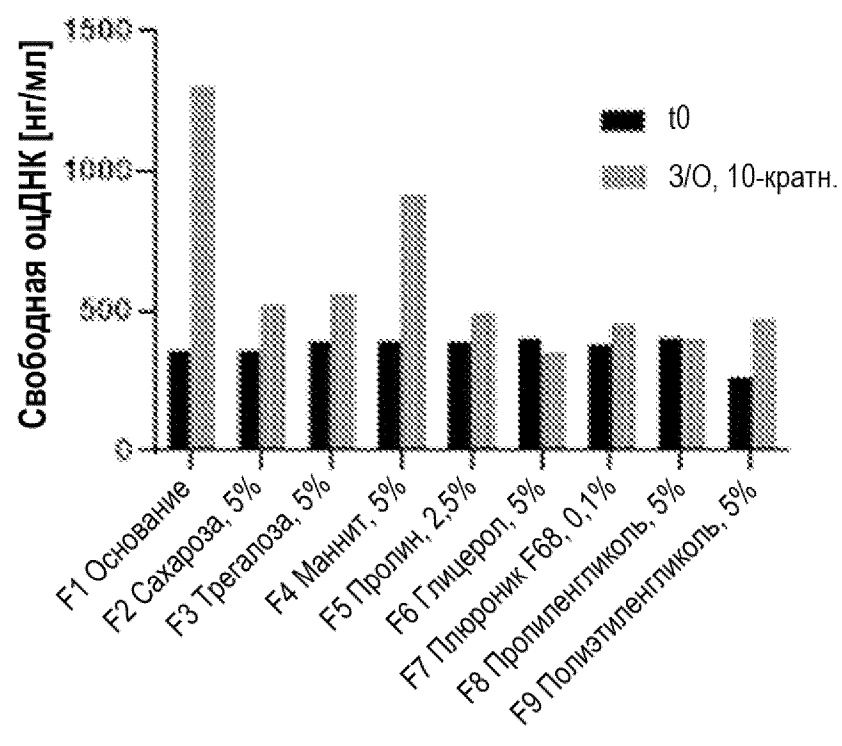
Фиг. 8



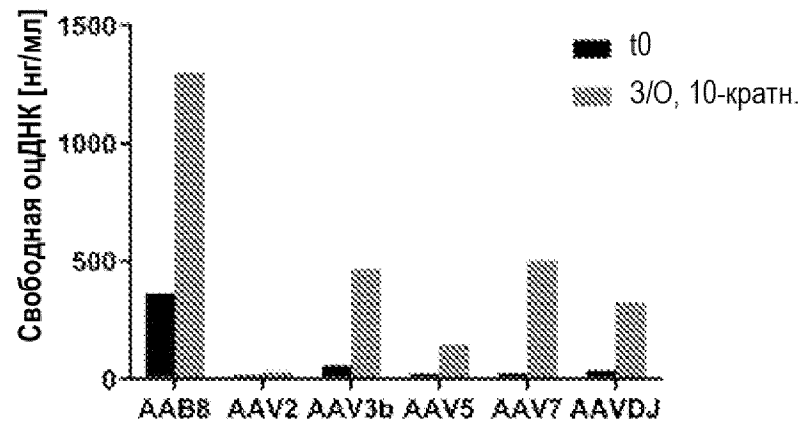
Фиг. 9А



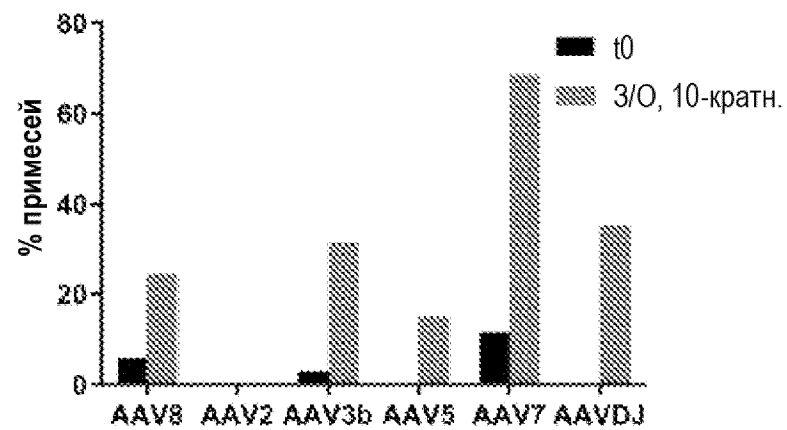
Фиг. 9В



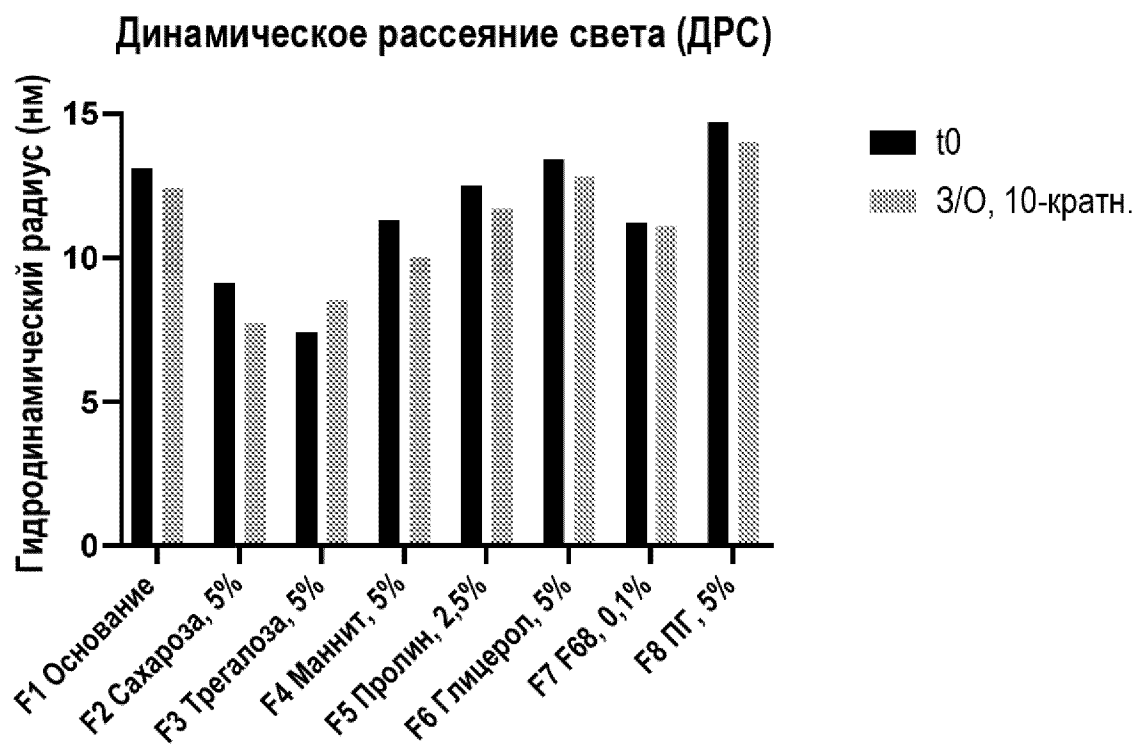
Фиг. 10А



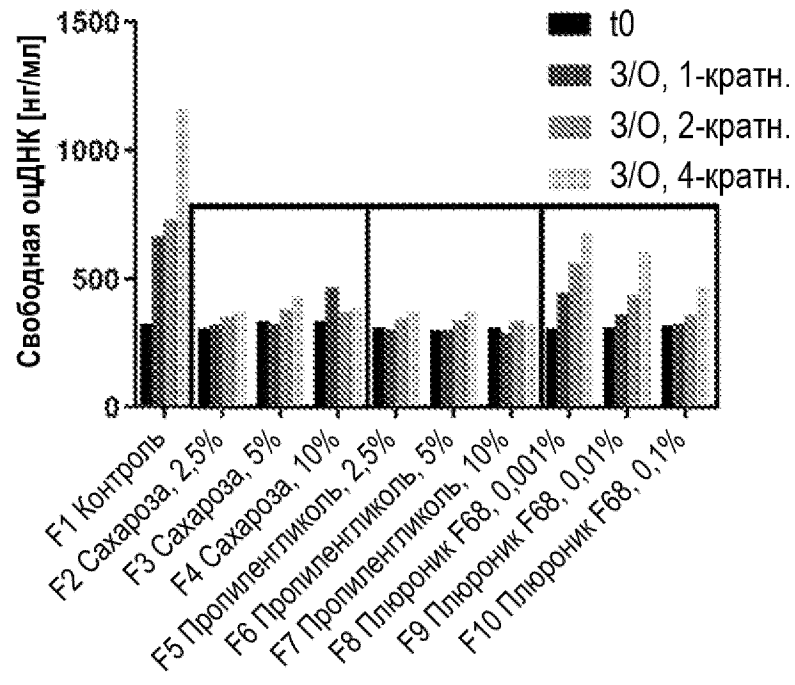
Фиг. 10В



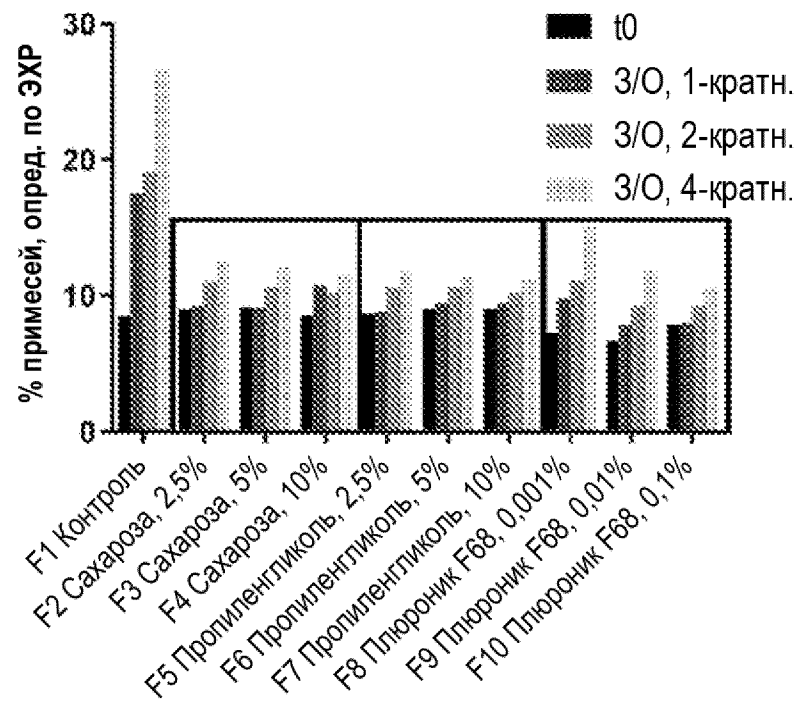
Фиг. 11



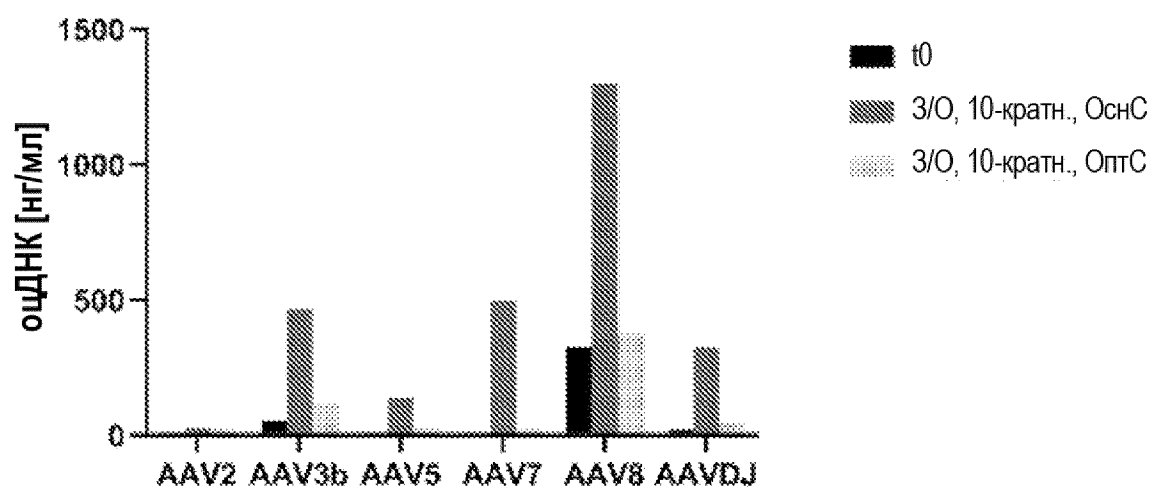
Фиг. 12А



Фиг. 12В



Фиг. 13А



Фиг. 13В

