



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113874514 A

(43) 申请公布日 2021.12.31

(21) 申请号 202080038925.9

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所

(22) 申请日 2020.05.22

11517

(30) 优先权数据

16/426,124 2019.05.30 US

代理人 赵昊 顾云峰

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.11.25

(51) Int.Cl.

C12N 15/86 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C12Q 1/6876 (2006.01)

PCT/US2020/034146 2020.05.22

C12Q 1/686 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/242913 EN 2020.12.03

(71) 申请人 崔泽尔有限公司

地址 英国牛津郡

(72) 发明人 J·迈克南 H·佩尔托宁

M·哈西宁 S·伊拉-赫图拉

N·帕克尔

权利要求书2页 说明书13页

序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

超高精度病毒载体测定法

(57) 摘要

在复制缺陷型病毒基因治疗载体的生产过程中,随机突变或其他事件可能会产生不需要的具有复制能力的病毒(“RCV”)。病毒基因治疗载体生产商因此对污染性RCV的存在进行测定,这通过测定连续感染,即,用病毒载体转导靶细胞,然后裂解转导的细胞,并然后将裂解液与活测定细胞混合在一起,并然后用显微镜观察测定细胞以视觉确定是否它们已被病毒感染来实现。我们已测试了各种替代途径,并且令人惊讶地发现,液滴数字PCR不仅比现有技术途径更快速,而且灵敏度高一个数量级,能够检测例如 3×10^{10} 个测定细胞中的低至七(7)个具有复制能力的腺病毒(“RC”)。



1. 一种用于鉴定能够在样本中的正常人细胞中复制的病毒的方法, 所述样本包含不能在正常人细胞中复制的病毒基因治疗载体, 所述方法包括:

a. 获得包含不能在正常人细胞中复制的病毒基因治疗载体的样本, 所述病毒载体包含转基因和病毒基因组, 所述病毒基因组是通过对野生型病毒基因组中的对所述病毒在正常人细胞中的复制至关重要的区域进行修饰或删除而从所述野生型病毒基因组遗传修饰得到的, 因此所产生的病毒基因治疗载体预期不能在正常人细胞中复制, 以及然后

b. 将所述样本与能够被所述病毒基因治疗载体转导的活靶细胞混合, 以制备转导混合物, 以及然后

c. 将所述转导混合物在足以使所述病毒基因治疗载体能够转导所述靶细胞的条件下维持一定时间, 以及然后

d. 从任何残留样本分离出所述靶细胞, 以及然后

e. 裂解所述靶细胞以使其细胞内内容物释放, 以及然后

f. 将裂解的靶细胞的所述细胞内内容物与能够被所述病毒感染的活测定细胞混合, 以制备感染混合物, 以及然后

g. 将所述感染混合物在足以使所述病毒(如有)能够感染所述测定细胞的条件下维持一段时间, 以及然后

h. 裂解所述测定细胞以使其细胞内内容物释放, 以及然后

i. 从所述测定细胞的细胞内内容物中分离出核酸, 以及然后

j. 使用与所述病毒基因组的已被修饰或删除的所述对于病毒复制至关重要的区域杂交的探针, 通过数字PCR评价分离的核酸,

从而测量所述样本中能够在正常人细胞中复制的病毒的近似数量。

2. 如权利要求1所述的方法, 其中所述病毒是腺病毒, 并且其中所述探针包含具有选自以下的序列的DNA探针: SEQ ID N0.1、SEQ ID N0.2和SEQ ID N0.3。

3. 如权利要求1所述的方法, 其中所述方法能检测每 3×10^{10} 个不能在正常人细胞中复制的病毒基因治疗载体颗粒中的低至25个能够在正常人细胞中复制的病毒。

4. 如权利要求3所述的方法, 其中所述方法能检测每 3×10^{10} 个不能在正常人细胞中复制的病毒基因治疗载体颗粒中的低至7个能够在正常人细胞中复制的病毒。

5. 如权利要求1所述的方法, 其中所述转基因表达选自由干扰素和p53组成的组的多肽。

6. 一种药物成品剂型, 其包含药学上可接受的赋形剂和不能在正常人细胞中复制的病毒基因治疗载体并且包含转基因, 所述剂型的每 3×10^{10} 个不能在正常人细胞中复制的病毒颗粒具有不超过大约25个能够在正常人细胞中复制的病毒颗粒。

7. 如权利要求6所述的药物成品剂型, 其每 3×10^{10} 个不能在正常人细胞中复制的病毒颗粒具有不超过大约7个能够在正常人细胞中复制的病毒颗粒。

8. 如权利要求6所述的药物成品剂型, 其中所述病毒是腺病毒。

9. 如权利要求6所述的药物成品剂型, 其中所述转基因表达选自由干扰素和p53组成的组的多肽。

10. 如权利要求9所述的药物成品剂型, 其中所述转基因表达干扰素。

11. 如权利要求10所述的药物成品剂型, 其每 3×10^{10} 个不能在正常人细胞中复制的病

毒颗粒具有不超过大约7个能够在正常人细胞中复制的病毒颗粒。

12. 如权利要求9所述的药物成品剂型,其中所述转基因表达p53。

13. 如权利要求12所述的药物成品剂型,其每 3×10^{10} 个不能在正常人细胞中复制的病毒颗粒具有不超过大约7个能够在正常人细胞中复制的病毒颗粒。

超高精度病毒载体测定法

- [0001] 相关申请的交叉引用:
- [0002] 本申请要求来自于2019年5月30日提交并通过引用方式并入本文的美国发明专利申请第16/426124号的优先权。
- [0003] 关于联邦政府资助研究或开发的声明:
- [0004] 不适用
- [0005] 联合研究协议各方的名称:
- [0006] 不适用
- [0007] 序列表参考:
- [0008] 本申请包括并通过引用方式并入本申请中记录的PatentInTM文件。
- [0009] 关于发明人或共同发明人的在先公开的声明:
- [0010] 不适用

背景技术:

- [0011] 某些病毒基因治疗载体被设计为无法在患者体内复制。例如,要在正常人类细胞中复制,腺病毒需要功能正常的E1a、E1b和E3基因组区域。通过删除这些区域或使其突变,可以使病毒基因治疗载体出现复制缺陷。
- [0012] 尽管如此,在病毒基因治疗载体的生产过程中,可能因随机突变或其他事件形成不需要的具有复制能力的病毒(“RCV”)。例如,E1a缺失的腺病毒载体可以在HEK293细胞中生产,该细胞包含功能性E1a区域。自发重组理论上可以将功能性E1a区域重新添加回腺病毒中,创建具有复制能力的腺病毒(“RCA”)。
- [0013] 因此,病毒基因治疗载体生产商测定复制缺陷病毒载体是否存在污染性RCV。监管机构,即欧洲药品管理局和美国食品药品管理局,要求通过使用通常被称为“滚瓶”测定法的方法测定连续感染来完成此操作。
- [0014] 在该方法中,靶细胞(例如,HEK细胞)在培养基中生长。然后加入病毒载体样本以转导靶细胞,并将细胞培养足够长的时间以使转导能够完成。然后将靶细胞沉淀并冲洗以去除培养基中的任何残留病毒载体。然后裂解靶细胞,并将裂解液添加到测定细胞(例如,HeLa细胞)的培养物中。然后使测定细胞在培养基中生长足够长的时间,以使感染性病毒(如果有的话)能够对测定细胞产生可见的感染。任选地,可以再将这些测定细胞沉淀、冲洗、裂解,并将裂解液加入测定细胞的第二培养物中,测定细胞转而在培养基中生长。通过显微镜确定可见感染,观察测定细胞以目视确定它们是否已被病毒感染。该目视检查是对可见细胞应激的评估;感染细胞明显变形且外观不佳,而在没有感染性病毒的情况下,测定细胞外观正常。该测试通常被称为“滚瓶”试验,因为测定细胞通常被培养在滚瓶中。
- [0015] 滚瓶测定法已被认为足够灵敏,能测定 3×10^{10} 个病毒颗粒中的<1个RCA。滚瓶试验有些主观,因为它依赖对测定细胞形态的显微镜观察。为了找到更客观的测定法,我们测试了各种替代途径。将替代测定法与行业标准滚瓶测定法比较时,我们惊奇地发现,与本领域的教示内容相反,滚瓶测定法的灵敏度不足以测定 3×10^{10} 个病毒颗粒中的<1个RCA。相

反,我们发现滚瓶测定法只能测定 3×10^{10} 个病毒颗粒中的 ≥ 75 个RCA。

[0016] 因此,我们已投入时间开发使用数字PCR的替代途径。这可以比现有技术途径更快速,提供更客观的数据,并且令人惊讶的是,灵敏度高一个数量级,能够检测例如 3×10^{10} 个病毒颗粒中低至七(7)个RCA。

发明内容:

[0017] 本公开描述了用数字聚合酶链反应(dPCR)检测具有复制能力的病毒(“RCV”),例如具有复制能力的腺病毒(“RCA”)的测定法。优选地,人们可以使用液滴数字PCR(ddPCR),因为该设备易于获得。我们的测定法包含多个RCA在细胞培养物中的扩增循环,以及通过ddPCR方法对扩增的RCA的检测。

附图说明:

[0018] 本专利或申请文件含有至少一幅彩色附图。在提出请求并支付必要费用后,专利局将提供具有一幅或多幅彩色绘图的本专利或专利申请公布的副本。

[0019] 图1提供了我们的测定法的流程图概述。

[0020] 图2是QuantaSoft软件用户界面的彩色照片或翻印。

[0021] 本专利或申请文件含有至少一幅彩色绘图。在提出请求并支付必要费用后,专利局将提供具有一幅或多幅彩色绘图的本专利或专利申请公布的副本。

具体实施方式:

[0022] 我们的测定法概述在图1中。在图1中,悬浮培养的HeLa细胞被用于扩增可能的RCA。将细胞以 7.5×10^7 个细胞/瓶的密度接种到500ml摇瓶中。向每个摇瓶中加入试验样本(TS)的 3×10^{10} 个病毒颗粒(Vp)。孵育(+37°C, 5%CO₂, 122rpm)三天后,收集细胞并用三个冻融循环裂解该细胞。通过离心使裂解液变澄清。

[0023] 然后将裂解液加入到具有新鲜测定细胞(2×10^7 个细胞/瓶)的125ml摇瓶中。按照与靶细胞培养物相同的方式处理这些第一测定培养瓶。

[0024] 然后将来自第一测定培养物的裂解液添加到第二测定培养物中(2×10^7 个细胞/瓶)。孵育三天后,收集第二测定培养细胞并使其裂解。通过离心使裂解液变澄清,并将其贮存在超低温冷冻器中。执行多个RCA扩增循环以最小化治疗性蛋白的干扰效应(例如,病毒载体中编码例如干扰素的转基因,其会阻碍干扰素敏感测定细胞的生长)并最大化RCA产量。

[0025] 通过数字聚合酶链反应(dPCR)方法检测裂解液中的RCA。我们更喜欢使用ddPCR,因此在下面对其讨论,但其他dPCR方法也可以使用。

[0026] 将裂解液用蛋白酶K预处理以释放包裹在病毒颗粒内的病毒DNA。

[0027] 用经预处理的裂解液作为ddPCR分析中的样本,该分析使用PCR引物和对已从病毒中被删除(从而使病毒不具有复制能力)的病毒基因组区域的一部分具有特异性的探针(例如,TaqMan探针)。例如,我们已用这种方法测定其中E1区域已被删除的腺病毒。E1区域对腺病毒复制至关重要,并因此从各种腺病毒基因治疗载体的基因组中被删除,但存在于野生型(感染性)基因组中。

[0028] 在我们的ddPCR分析中,我们制备了包含超混液(supermix)、引物和探针的混合物,然后将其移液到96孔板上的三个平行孔中。将裂解液样本(来自上面)添加到每个孔中。然后我们使用自动化液滴生成器生成数千个小液滴。样本DNA随机分配在液滴之间。通过PCR扩增液滴内的DNA。使用计数阳性和阴性液滴的读数器读取液滴。结果是用泊松分布计算并表示为拷贝/微升表示。

[0029] 我们已将该方案用于复制缺陷型腺病毒基因治疗载体,但从概念上讲,可以将其用于任何其他具有适合于PCR分析的基因组的复制缺陷型病毒。类似地,我们已经在含有血管内皮生长因子D(“VEGF-D”)的转基因的病毒载体上测试了该系统,但可以将其与具有另一种转基因的载体一起使用。

[0030] 作为所述测定法的参考标准(RS),我们按 1.77×10^{11} vp/ml的密度使用I期临床级材料。按照与测试样本(TS)相似的方式处理了RS。我们准备了两个平行RS烧瓶。与参考标准相比报告TS的结果。

[0031] 通过阴性对照(NC)控制扩增。NC是通过用细胞培养基“模拟感染”所述细胞来制备。NC是作为单个烧瓶制备的,因为我们知道预期结果。

[0032] 我们使用了阳性对照(PC),其是通过用100vp的野生型(具有复制能力)腺病毒参考材料(“ARM”)(ATCC目录号VR-1516)感染靶细胞来制备的。我们仅将PC用于趋势分析目的,按一式两份制备PC。

[0033] 通过无模板对照(NTC)控制ddPCR。在NTC中,将样本替换为用于稀释样本的相同细胞培养基和纯化ARM DNA的阳性对照(其中从ARM材料中提取的无细胞DNA用作样本)。我们使用了322.1ng/μl的原始ARM DNA浓度。然后将ARM DNA稀释到10ng/μl,并等分成12μl/管的等分试样。将等分试样贮存在-20°C。每个等分试样应被解冻不超过五(5)次,以最小化对DNA的冻融损伤。我们更喜欢将每次解冻记录或记载在解冻管上,并在第5次解冻后丢弃并等分。

[0034] 所述测定法使用在补充有10%FBS/Pen/Strep/L-谷氨酰胺的DMEM中培养的HeLa QCWCB2细胞。将细胞在不同大小的悬浮摇瓶中培养,例如在配备有摇床平台的CO₂孵育箱或New Brunswick S41iTM孵育箱摇床中孵育。

[0035] 我们发现,该过程如果在第一次感染、第二次感染和第三次感染之日由两名操作员执行最有效。一名操作员接种用于所述测定法的HeLa悬浮细胞(7至15个烧瓶用于感染,1至5个烧瓶用于进一步培养)。另一名操作员准备用于第一次感染的病毒稀释液,或在第二次和第三次感染期间使受感染的细胞裂解。收获和dPCR分析仅需要一名操作员。

[0036] 细胞培养

[0037] 细胞培养是根据无菌技术执行的。HeLa QCWCB2细胞是悬浮培养的。RCA测定法所需的细胞瓶数量取决于待分析的TS数量。一个烧瓶用于NC,两个烧瓶用于RS,两个烧瓶用于PC。每个TS将作为平行样进行分析。在一次测定中可以分析最多5个TS(总共15个烧瓶)。

[0038] 为了获得所需数量的烧瓶,需要将培养适当放大。表I列出了我们推荐的用于开始用不同数量的试验样本(TS)进行测定的待接种的烧瓶的最低数量。250ml和500ml的摇瓶可以互换,因此一个500ml烧瓶相当于两个250ml烧瓶。注意,放大需要尽早开始以获得所需数量的细胞:对于4-5个TS的测定,这意味着在开始测定前大约两周开始,对于1-3个TS的测定则在开始测定前一周开始。

表 I. 放大用于 RCA 测定的 HeLa 悬浮培养									
			烧瓶数量						
周	天	任务	对于	对于	对于	对于	对于	烧瓶尺寸	
			5 个 TS	4 个 TS	3 个 TS	2 个 TS	1 个 TS		
[0039]	1	周四/周五	细胞培养	2	2	1	1	1	250 ml
	2	周一/周二	细胞培养	4	4	3	3	2	250 ml
	2	周五	细胞培养	9	8	7	5	4	500 ml
	3	周二	第一次感染	15	13	11	9	7	500 ml
	3			5	4	4	3	3	250 ml
	3	周五	第二次感染	15	13	11	9	7	125 ml
	4			4	4	3	3	2	250 ml
	4	周一	第三次感染	15	13	11	9	7	125 ml
				1	1	1	1	1	250 ml

[0040] 列出了推荐的用于开始用不同数量的试验样本 (TS) 进行测定的待接种的烧瓶的最低数量。放大应在测定前1-2周开始。工作日是示例性的，并可以根据需要进行调整。标明了测定法所需的烧瓶；此外，需要同时接种多个烧瓶用于进一步培养。

[0041] 在接种细胞用于RCA测定之前，监测培养物的生长并对细胞进行计数。我们更喜欢使用以下针对细胞的系统适用性标准 (SSC)：细胞活力 $\geq 80\%$ 和细胞计数的RSD% (相对标准偏差) $\leq 20\%$ 。

[0042] 在RCA测定中接种要感染的细胞时，我们更喜欢使用如表II中列出的接种参数。

表 II: 用于 RCA 测定的细胞接种参数			
RCA 测定 步骤	烧瓶尺寸	细胞/烧瓶	体积/烧瓶 (ml)
第一次感染	500 ml	1.00E+08	100 ¹⁾
第二次感染	125 ml	2.00E+07	40
第三次感染	125 ml	2.00E+07	40

1) 将在感染后 90 \pm 10 min 加入 100 ml 培养基

[0044] 我们更喜欢在500ml烧瓶中按 1×10^8 个细胞/烧瓶执行第一次感染。将该细胞量接种在100ml培养基中。感染后，加入100ml培养基。烧瓶中的最终细胞密度为 5×10^5 个细胞/ml。每个烧瓶的供试品剂量为 3×10^{10} 个vp。每个细胞的剂量为300vp/细胞。第二次和第三次感染是在125ml烧瓶中，按 2×10^7 个细胞/烧瓶在40ml培养基中执行。细胞密度为 5×10^5 个细胞/ml。在同一天对接种的细胞进行感染。

[0045] 第一次感染/转导：

[0046] 对于第一次感染(或“转导”，其中使用含转基因的重组病毒)，在冷培养基(从冰箱

中取出)中制备病毒载体稀释液。在整个方案中避免交叉污染。病毒样本在适用时按以下顺序被处理:1) NC, 2) TS, 3) RS, 4) PC。

[0047] a) 标记病毒滴度 (vp/ml)。

[0048] b) 计算病毒稀释度。

[0049] c) 使该工作与操作员接种细胞同步,以便病毒稀释液和待感染的细胞大约同时准备就绪。

[0050] d) 将RS、ARM和TS在冰箱中解冻,并在临用前将它们冷藏。

[0051] e) 取所需体积的冷培养基,置50ml管中。所需体积如下:PC的初步稀释液需要大约7.0ml,NC、RS和PC烧瓶的最终稀释液需要大约8.5ml,每个TS需要大约4.5ml。(因此,一个TS需要大约20ml,五个TS需要大约40ml)。

[0052] f) 根据表III制备PC (ARM) 的初步稀释液液。我们发现ARM必须通过一系列稀释进行大量稀释,以便在适当的体积中达到所需的剂量。每个稀释液在用于制备下一个稀释液之前,都需要充分混合。

表 III: ARM 的稀释系列

稀释	稀释因子	需使用的稀释液	稀释体积(μl)	培养基体积(μl)	总体积(μl)	最终浓度(vp/ml)
稀释液 1	100	纯	10	990	1000	5.8×10^9
稀释液 2	100	稀释液 1	10	990	1000	5.8×10^7
稀释液 3	100	稀释液 2	10	990	1000	5.8×10^5
稀释液 4	100	稀释液 3	10	990	1000	5.8×10^3

PC	58	稀释液 4	43	2457	2500	100
----	----	-------	----	------	------	-----

[0054] 纯 ARM (5.8×10^{11} 个 vp/ml) 将被用于制备稀释 1。将使用前面的稀释液制备以下稀释液 2 - 4 和最终 PC。

[0055] g) 制备最终稀释液。首先用移液管将培养基移取至所有管中,然后仅移取供试品、RS和作为最后一个的PC。注意,为RS、PC和每个TS准备两个平行的稀释液。在制备后90分钟内使用稀释液。

[0056] h) 用培养基 (NC) 并用最终稀释液感染500ml摇瓶中的在100ml培养基中的 1×10^8 个细胞。使用所有稀释液 (2ml) 进行感染。

[0057] i) 感染后大约90分钟 ($\pm 10\text{min}$), 将100ml新鲜预热的培养基加入到含有感染的细胞的烧瓶中。

[0058] j) 将烧瓶与受感染的细胞一起孵育三天 ($+37^\circ\text{C}, 5\% \text{CO}_2, 122\text{rpm}$)。

[0059] 注意,第一次感染后可以暂停测定。按照上面步骤a) -h) 操作。将上清液转移到干净的15ml无菌离心管中。用液氮快速冷冻该管,并将其在超低温冰箱中贮存最多两个月。在第二次感染当天,将冷冻上清液在冰箱中解冻,并使用所有上清液感染新鲜细胞。

[0060] 第二次感染:

[0061] 对于第二次感染,需要用培养基(从冰箱中取出)重新悬浮细胞。病毒样本在适用时按以下顺序被处理:1) NC,2) TS,3) RS,4) PC。

[0062] a) 使该工作与操作员接种细胞同步,以便感染用上清液和需感染的细胞几乎同时准备就绪。

[0063] b) 给液氮容器充满液氮。

[0064] c) 将感染的细胞悬液(200ml)从每个摇瓶中转移到50ml无菌管中(4个管/样本)。

[0065] d) 将细胞在+4℃下以1000xg离心10分钟。

[0066] e) 除去上清液。

[0067] f) 用5ml新鲜的冷培养基重新悬浮一个样本的细胞沉淀。在一个管中加入培养基,通过用移液管吹吸(pipetting)来使该沉淀重新悬浮,将悬浮液转移到同一样本的第二个管中,再次重新悬浮并重复,直到样本的所有四个管都被处理。

[0068] g) 将悬浮液转移到15ml无菌离心管中(1个管/样本)。

[0069] h) 通过用液氮冷冻(大约5min)和在水浴中在+37℃解冻(大约10min)的3个循环,对细胞进行裂解。将管放置在金属笼中,该金属笼可被排成一列浸入液氮和温水中。每次冷冻后,在将该管放入温水中之前,检查它们是否完好无损。每次解冻后,再次确认该管上没有裂缝,并低速涡旋该管。在一个冻结步骤期间可以暂停工作。保持样本冷冻(液氮/-80℃),直到您准备好继续。

[0070] i) 将裂解的细胞在+4℃下以2000xg离心20分钟,以去除细胞碎片。保留上清液。

[0071] j) 如果需感染的HeLa悬浮细胞尚未准备就绪,将上清液转移到干净管中并冷藏(冰箱)至细胞准备就绪。

[0072] k) 用在40ml中的 2×10^7 个细胞以及上清液对125ml摇瓶进行感染。使用所有上清液(约5ml)进行感染。

[0073] l) 将烧瓶与受感染的细胞一起孵育三天(+37℃,5%CO₂,122rpm)。

[0074] 在第二次感染后可以暂停测定。按照上面步骤a) -h) 操作。将上清液转移到干净的15ml无菌离心管中。用液氮快速冷冻该管,并将其在超低温冰箱中贮存最多两个月。在第三次感染当天,将冷冻上清液在冰箱中解冻,并使用所有上清液感染新鲜细胞。

[0075] 第三次感染:

[0076] 对于第三次感染,将冷培养基(从冰箱中取出)用于重新悬浮细胞。病毒样本在适用时按以下顺序被处理:1) NC,2) TS,3) RS,4) PC。

[0077] a) 使该工作与操作员接种细胞同步,以便感染用上清液和需感染的细胞几乎同时准备就绪。

[0078] b) 给液氮容器充满液氮。

[0079] c) 将感染的细胞悬液(40ml)从每个摇瓶中转移到50ml无菌管中(1个管/样本)。

[0080] d) 将细胞在+4℃下以1000xg离心10分钟。

[0081] e) 除去上清液。

[0082] f) 用2ml新鲜的冷培养基重新悬浮一个样本的细胞沉淀。如果颗粒非常致密且难以重新悬浮，则可以增加重新悬浮体积。

[0083] g) 将悬浮液转移到15ml无菌离心管中(1个管/样本)。

[0084] h) 通过用液氮冷冻(大约5min)和在水浴中在+37°C解冻(大约10min)的3个循环，对细胞进行裂解。将管放置在金属笼中，该金属笼可被排成一列浸入液氮和温水中。每次冷冻后，在将该管放入温水中之前，检查它们是否完好无损。每次解冻后，再次确认该管上没有裂缝，并低速涡旋该管。在一个冻结步骤期间可以暂停工作。保持样本冷冻(液氮/-80°C)，直到您准备好继续。

[0085] i) 将裂解的细胞在+4°C下以2000xg离心20分钟，以去除细胞碎片。保存上清液。

[0086] j) 如果需感染的HeLa悬浮细胞尚未准备就绪，则将上清液转移到干净管中并冷藏(冰箱)至细胞准备就绪。

[0087] k) 用在40ml中的 2×10^7 个细胞以及上清液对125ml摇瓶进行感染。使用所有上清液(约2ml)进行感染。

[0088] 1) 将烧瓶与受感染的细胞一起孵育三天(+37°C, 5% CO₂, 122rpm)。

[0089] 收获：

[0090] 为了收获，可以根据表IV打印样本标签。每个被感染细胞的烧瓶需要四个标签：两个标签上标有等分试样量为110μl，两个标签上标有<1000μl。

表 IV：收获物等分试样的示例标签		
	实施例 1	实施例 2
RCA-yy-nnn	RCA-19-001	RCA-19-002
年-月-日/首字母	2019年2月21日/HP	2019年1月17日/MJK
样本名称	NC	TS1_1
等分试样量	110 μl	<1000 μl

[0092] 重新悬浮细胞需要冷培养基(从冰箱中取出)。病毒样本在适用时按以下顺序被处理：1) NC, 2) TS, 3) RS, 4) PC。

[0093] a) 给液氮容器充满液氮。

[0094] b) 标记1ml冻存管用于收获物等分试样。

[0095] c) 将感染的细胞悬液(40ml)从每个摇瓶中转移到50ml无菌管中(1个管/样本)。

[0096] d) 将细胞在+4°C下以1000xg离心10分钟。

[0097] e) 除去上清液。

[0098] f) 用2ml新鲜的冷培养基重新悬浮一个样本的细胞沉淀。如果颗粒非常致密且难以重新悬浮，则可以增加重新悬浮体积。

[0099] g) 将悬浮液转移到15ml无菌离心管中(1个管/样本)。

[0100] h) 通过用液氮冷冻(大约5min)和在水浴中在+37°C解冻(大约10min)的3个循环，对细胞进行裂解。将管放置在金属笼中，该金属笼可被排成一列浸入液氮和温水中。每次冷冻后，在将该管放入温水中之前，检查它们是否完好无损。每次解冻后，再次确认该管上没有裂缝，并低速涡旋该管。在一个冻结步骤期间可以暂停工作。保持样本冷冻(液氮/-80°C)，直到您准备好继续。

- [0101] i) 将裂解的细胞在+4℃下以2000xg离心20分钟,以去除细胞碎片。保存上清液。
- [0102] j) 将上清液转移到新的干净管中并混合。
- [0103] k) 将每个样本的上清液等分到预先标记的1ml冻存管:2×110μl;2×<1000μl中。
- [0104] l) 用液氮快速冷冻等分试样并将其贮存在冷冻器中直至分析。

[0105] 数字PCR分析:

[0106] DNA工作应在无核酸酶的条件下进行。必须使用无菌无核酸酶溶液和塑料器具。处理DNA样本时必须始终佩戴手套。DNA-ExodusPlus™可用于去除工作后可能的DNA残留物。清洁专用于DNA样本的层流罩(laminar flow hood, “LFH”)后,可通过紫外线照射过夜对LFH进行灭活。

[0107] 为了预处理收获物样本,将收获物样本在室温下解冻最多一小时。用移液管将样本(100μl/孔)移至96孔板上:用移液管将NC移至A4孔上。用移液管将RS_1、RS_2、PC_1、PC_2、TS1_1和TS1_2移至第1列的B1-G1孔上。用移液管将其余TS移至第6列的A6-H6孔上。向已用的孔中添加蛋白酶K(1μl/孔)。用光学胶盖密封板。轻轻涡旋并简短离心。使用Applied Biosystems 7500实时PCR系统及最新版本的SDS模板文档“Prot K”运行该板。运行程序如下:在+50℃下孵育60分钟。在+95℃下孵育20分钟。将样本冷却至+4℃。如果不继续直接进行样本稀释,则将板贮存在冰箱中。

[0108] 对于样本稀释,需要将样本稀释到落在ddPCR分析的动态范围上。分析中使用1:1000和1:10000的稀释度。如果这些稀释度都不可接受,则可以测试更高或更低的稀释度。用移液管将细胞培养基(90μl/孔)移到96孔板的含有预处理收获样本的B2-G5孔上。用移液管将细胞培养基(90μl/孔)移到A7-H10孔上。用移液管将细胞培养基(90μl/孔)移到H4孔上。将用这个孔制备用于ddPCR分析的NTC。通过用移液管吹吸彻底混合第1列和第6列上的预处理样本。从第1列一直到第5列以及从第6列一直到第10列制备稀释系列。用移液管将10μl从第1列移到第2列,并通过用移液管吹吸彻底混合所制备的稀释液。用移液管将10μl从第2列移到第3列并进行混合。继续直至第5列准备就绪并被混合。对第6-10列重复相同的操作。如果不直接进行ddPCR分析,则将板贮存在冰箱中。

[0109] 准备ddPCR板:

[0110] 为准备ddPCR板,从针对产物释放的每项RCA测定的10ng/μl等分试样制备新鲜1pg/μl的ARM DNA稀释液。ARM DNA的稀释系列参见表V。

[0111] 表V:制备待在ddPCR分析中用作PC的ARM DNA的稀释系列

[0112]	名称	稀释因子	需使用的稀释液	稀释液体积(μl)	水量(μl)	总体积(μl)	最终浓度
--------	----	------	---------	-----------	--------	---------	------

[0113]	稀释液 1	10	纯	2	18	20	1 ng/μl
	稀释液 2	10	稀释液 1	5	45	50	0.1 ng/μl
	稀释液 3	10	稀释液 2	10	90	100	10 pg/μl
	ARM DNA	10	稀释液 3	10	90	100	1 pg/μl

[0114] 在将每个稀释液用于制备下一个稀释液之前,都需要通过用移液管吹吸来充分混合。在DNA LFH中制备稀释液。在ddPCR运行中使用名为ARM DNA (1pg/μl) 的最后一个稀释液。需使用的体积为5μl,即每个反应中使用5pg ARM DNA。

[0115] 对于针对产物释放的每项RCA测定,制备RCA的正向引物、反向引物和TaqMan探针的新鲜稀释液。在我们的实验中,我们使用了E1缺失的腺病毒,因此使用5'-AAC CAG TTG CCG TGA GAG TTG-3'作为RCA的正向引物;使用5'-CTC GTTAAG CAAGTC CTC GAT ACA-3'作为RCA的反向引物;以及使用5'-TGG GCG TCG CCAGGC TGT G-3'作为RCA的TaqMan探针。

[0116] 将该试剂在室温下解冻,混合并离心(例如,使用离心机/涡旋机)。有关稀释说明,请参见表VI。

表 VI: RCA 正向引物、RCA 反向引物和 RCA 的 TaqMan 探针的稀释						
试剂	稀释因子	原浓度	试剂体积(μl)	水量(μl)	总体积(μl)	最终浓度
正向	16.7	100000 nM	19	297	316	6000 nM
反向	16.7	100000 nM	19	297	316	6000 nM
探针	40	100000 nM	8	312	320	2500 nM

[0118] 稀释液是在预混液层流 (Master mix laminar) 中制备的。在ddPCR运行中使用最终浓度的引物 (6000nM) 和探针 (2500nM)。向反应混合物中加入2.5μl体积的每种试剂,总体积为25μl。反应混合物中引物的浓度为600nM,探针的浓度为250nM。对于分析开发、过程中样本和表征目的,可以使用贮存在-20℃下的早期制备的稀释液。预混液在专用于预混液制备的LFH中制备。将样本添加到板上DNA LFH中。对预混液和DNA工作使用单独的材料、移液管和离心机/涡旋机。计算所需的孔量和所需的预混液总体积。在室温下解冻用于探针的ddPCR超混液,并在解冻时在高速下进行涡旋。混合RCA的稀释正向引物、反向引物和TaqMan探针并离心该试剂。我们发现离心机/涡旋机可方便地用于混合和离心。按照表VII制备用于ddPCR的预混液,并在高速下进行涡旋。

表 VII: 用于 ddPCR 的预混液的成分。		
试剂	体积/反应(μl)	113 次反应所需的体积(μl)
用于探针的 ddPCR 超混液	12.5	1412.5
用于 RCA 的正向引物	2.5	282.5
用于 RCA 的反向引物	2.5	282.5
用于 RCA 的 TaqMan 探针	2.5	282.5
总体积	20	2260

本实例针对的是最大数量的试验样本。根据需要修改体积。

[0119] [0120] 用移液管将预混液(20μl/孔)移到96孔板的孔上。任选地,可以将预混液倒在试剂容器上,并且可以使用多通道移液器将混合物移取到板上。将ddPCR缓冲液对照试剂盒(BC, 25μl/孔)添加至H4-H6孔和样本不需要的孔上。对于最大数量的试验样本,注意每列的所有孔都需要被填充。ddPCR缓冲液对照试剂盒(“BC”)被用在样本不需要的孔上。我们更喜欢使用含有例如1:1000和1:10000稀释液的孔。

[0121] 我们更喜欢通过涡旋混合含预处理样本和稀释液的96孔板,并将样品离心。添加样本(5μl/孔)到含有预混液的ddPCR板(20μl/孔)中。使用后,将样本板贮存在冰箱中。样本可以用于重复执行ddPCR分析。

[0122] 对于对照,通过用移液管吹吸混合ARM DNA稀释液,并添加(5μl/孔)到ddPCR板(A4、A5和A6孔)中。

[0123] 使用板密封剂(plate sealer)用Heatfoil将该板在+180℃下密封5秒。短暂地涡旋该板并将样本混合物离心。继续执行液滴生成和PCR运行。

[0124] 液滴生成、PCR读取和液滴读取:

[0125] 我们更喜欢使用AutoDGTM设备执行自动液滴生成。为了做到这一点,我们使用板密封剂用Heatfoil将含液滴的板在+180℃下密封5秒。然后继续执行PCR运行。我们更喜欢使用C1000TM Touch热循环仪用如表VIII中所示的PCR条件运行该板。

表 VIII: 用于 RCA 测定的 PCR 条件

[0126]

步骤	条件			
	温度	时间	斜升	周期
初始变性	+95°C	10 min	2°C/s	1
变性	+94°C	30 s	2°C/s	40
退火/延伸	+60°C	1 min	2°C/s	
酶失活	+98°C	10 min	2°C/s	1
保持	+4°C	∞	不适用	1

盖的温度被设置为+105°C。样本体积为 40 μl, 因为
AutoDG 设备将 20 μl 反应混合物与 20 μl AutoDG 油混合

[0127]

在一起。

[0128] 在PCR运行后,液滴是稳定的。可将该板在冰箱中贮存过夜。使用具有最新版本的QuantaSoft模板“RCA ddPCR”的液滴读数器读取液滴。QuantaSoft软件会自动为该运行创建文件夹,并将该运行作为QuantaSoft板文件保存。运行后,如下将所有孔的阈值手动设置为2000:单击左侧菜单中的“分析”按钮;从右上角的板布局中选择所有孔;选择“一维幅度”显示;在左侧菜单的底部,激活带有黄色标记的按钮(多孔工具)。这允许您同时设置所有孔的阈值。通过在设定阈值(Set Threshold)框中输入2000来设置阈值(按回车键(Enter))。有关阈值设置的可视化和软件用户界面的更详细说明,请参见图2。关闭QuantaSoft软件并在软件提示选择“保存板信息?”时单击“是”。将创建的文件夹复制到服务器,并确保它以测定运行编号作为文件夹名称。

[0129] ddPCR运行数据由QuantaSoft软件自动分析。评估SSC的完成情况,并用软件读取结果。

[0130] 数据分析:

[0131] 在ddPCR技术中,样本DNA在数千个液滴之间随机分配。存在的液滴越多,分析的准确性就越好。QX200 ddPCR系统能够生成和读取每孔20000多个液滴。为确保所需的准确性,为每个分析孔设置了≥8000个合格液滴(accepted droplet)的标准。然而,尽管个别孔不符合此标准,但该测定并非不合格。在进一步分析中忽略了不合格的孔。在ddPCR分析中,每个样本都在三个平行孔中进行分析。如果三个平行孔中至少有两个孔具有≥8000个合格液滴,则可以读取该样本的结果。为检查合格液滴的数量,请按以下步骤操作:打开保存在服务器上的板文档(阈值2000)。单击左侧菜单上的“分析(Analyze)”按钮。从右上角的板布局中选择所有孔。选择“事件(Events)”显示。勾选右侧的“总计(total)”框。为清楚起见,其他框(阳性/阴性)不应该打勾。根据直方图上的值检查每孔具有≥8000个合格液滴。

[0132] NC、NTC和ARM DNA的系统适用性标准是三个平行孔中至少有两个孔具有≥8000个合格液滴。确认是否符合该标准。如果不符该标准,则需要重复ddPCR分析。在考虑进一步

的SSC时,只考虑具有 ≥ 8000 个合格液滴的孔。

[0133] 在ddPCR分析中,具有 ≤ 5 个阳性液滴的样本被认为是阴性的。具有6-34个阳性液滴的样本不能被视为阴性,但可能被污染或代表极少量的目标DNA。具有 ≥ 35 个阳性液滴的样本被视为明确阳性。每个孔上的阳性和阴性液滴的数量通过上述程序a) - e) 来检查,但勾选阳性框或阴性框而不是总数。

[0134] NC、NTC和ARMDNA的测定SSC是:NC样本的任何合格孔中的阳性液滴不超过5个,或NTC的任何合格孔中的阳性液滴不超过5个,或ARM DNA的三个平行孔中至少两个孔显示出 ≥ 35 个阳性液滴。

[0135] 如果这些SSC不合格,我们希望重复该ddPCR。如果NC仍然不合格,我们建议从第一次感染开始重复整个RCA测定。不合格的原因是NTC或ARM DNA,则RCA扩增可能已成功,但ddPCR分析存在一些问题。在NTC或ARM DNA反复不合格的情况下,需要调查不合格的原因。

[0136] 为了读取某个样本的结果,该样本应同时具有阳性液滴和阴性液滴。如果阴性液滴的数量少,分析的准确性会受到影响。该孔应该显示出 >100 个阴性液滴。否则,该孔将被视为“饱和”,并且无法读取该孔的结果。

[0137] ddPCR分析的动态范围较窄。RS和TS是按两个稀释度进行分析:1:1000和1:10000。至少一个稀释度需要在该范围内。可接受的RS稀释液的标准是三个平行的孔中至少有两个孔显示出 ≥ 8000 个合格液滴、 >100 个阴性液滴(孔未饱和)和 ≥ 35 个阳性液滴(孔显示出阳性结果)。

[0138] 用一个或多个可接受的稀释度评价测定SSC。RS的测定SSC是:RS_1和RS_2两者在可接受的孔中在一个或多个可接受的稀释度下都显示出阳性结果(≥ 35 个阳性液滴)。如果RS_1和RS_2两者具有至少一个可接受的稀释度,则SSC通过。SSC不合格的原因可能是稀释不当。使用的稀释度可能太低(孔饱和)或太高(阴性结果)。在这种情况下,可以用调整过的稀释度重复ddPCR。可以酌情使用来自预处理板的1:10和/或1:100稀释液,或者可以从1:10000制备进一步的稀释液。咨询专家以决定如何继续进行。如果平行的烧瓶之一(RS_1或者RS_2)仍然显示出阴性结果,而另一个烧瓶在动态范围内,则需要从第一次感染开始重复整个RCA测定。

[0139] 可接受的TS稀释度的标准是,三个平行孔中至少有两个孔显示出 ≥ 8000 个合格液滴和 >100 个阴性液滴(孔未饱和)。用一个或多个可接受的稀释度评价样品SSC。注意,由于TS可能不合RCA,因此TS不需要通过 ≥ 35 个阳性液滴的标准。

[0140] 样品SSC是:TSX_1和TSX_2两者都具有至少一个可接受的稀释度。如果样本未通过SSC,则无法报告其结果,并且需要重新分析该样本。然而,其他样本的结果都可以读取和报告。SSC不合格的原因可能是稀释不当。使用的稀释度可能太低(孔饱和)。在这种情况下,可以用调整过的稀释度重复ddPCR。可以从1:10000制备进一步的稀释液。

[0141] RCA测定结果:

[0142] ddPCR分析结果被表示为拷贝/微升。QuantaSoft软件在左上角的结果表中报告每个孔的该值。如果孔上没有阳性液滴,则该值为0;如果孔上没有阴性液滴,则该值为1000000(饱和)。为计算RS和TS的结果,记录QuantaSoft软件的结果表中报告的每个孔的浓度(拷贝/微升)。仅记录合格孔和稀释液的浓度;否则标记N/A。然后通过将报告的浓度乘以

稀释因子来计算调整后的浓度(拷贝/微升)。然后计算调整后浓度的平均值(拷贝/微升)。将其记录为没有小数位的整数。注意,如果某个TS的平行烧瓶之一(TSX_1或者TSX_2)在两个稀释度都产生阴性结果,则从阳性烧瓶计算平均值。对于RS,将RS范围计算为平均值±20%:范围的下限是0.8×平均值,范围的上限是1.2×平均值。将TS的结果与该RS范围进行比较。对于每个TS,将平均值与RS范围比较。如果平均值低于RS范围,则结果为“RCA比RS中的少”。如果平均值在RS范围内,则结果为“RCA量与RS中的相等”。如果平均值高于RS范围,则结果为“RCA比RS中的多”。

[0143] 如果某个TS的平行烧瓶之一(TSX_1或者TSX_2)在两个稀释度下都产生阴性结果,另一个烧瓶产生明确的阳性结果,则平均值(拷贝/微升)是基于阳性烧瓶。如果与RS范围的比较得出“RCA比RS中的多”的结果,则需要重复ddPCR分析。如果结果仍然相同,则需要从第一次感染开始重复整个RCA测定。

[0144] 可将测定结果趋势分析成ExcelTM文件。我们更喜欢对以下参数进行趋势分析:

[0145] • RCA测定运行编号

[0146] • 测定SSC合格/不合格

[0147] • SSC可能不合格的原因

[0148] • ARM DNA的结果(拷贝/微升)

[0149] • RS和PC的可接受稀释度

[0150] • RS和PC的平均值(拷贝/微升)(注意,PC的平均值只在趋势excel中计算)。

[0151] 根据我们的公开,技术人员可以很容易地对其进行修改。例如,虽然我们实际上已经使用带有血管内皮生长因子D的转基因的重组腺病毒开发了我们的改良测定法,但我们的测定法还可以在含其他转基因(例如,p53、干扰素等)的载体中鉴定具有复制能力的污染病毒。

[0152] “感染”是指病毒在靶细胞中复制从而形成后代。相反,“转染”是指将外来DNA或RNA通过病毒载体递送到靶细胞中。转染不需要病毒在靶细胞中复制。

[0153] 类似地,虽然我们实际上在预期在人类患者中根本不会复制的病毒载体上测试了我们的测定法,但我们的测定法也可以很容易地在预期会有条件地复制(replicate conditionally),例如,仅在人癌细胞中复制,但在人正常细胞中不复制的病毒载体上使用。因此,我们在随附的法律权利要求书中使用短语“无法在人正常细胞中复制”来指示这一点。

[0154] 类似地,虽然我们的实验是在腺病毒上进行的,但我们的方法对于其他类型的基因治疗病毒载体也同样有用。

[0155] 因此,我们预期我们专利的法律覆盖范围不是由我们的上面描述的特定实验室工作限定,而是由我们随附的法律权利要求书及其允许的等价物限定。

序列表

<110> 崔泽尔有限公司 (Trizell Ltd.)

<120> 超高精度病毒载体测定法

<130> US16/426124

<150> US16/426124

<151> 2019-05-30

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 5型腺病毒 (Adenovirus type 5)

<400> 1

aaccagttgc cgtgagagtt g 21

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> 5型腺病毒 (Adenovirus type 5)

<400> 2

ctcgtaagg aagtccctcg a taca 24

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> 5型腺病毒 (Adenovirus type 5)

<400> 3

tggcgctgc caggctgtg 19

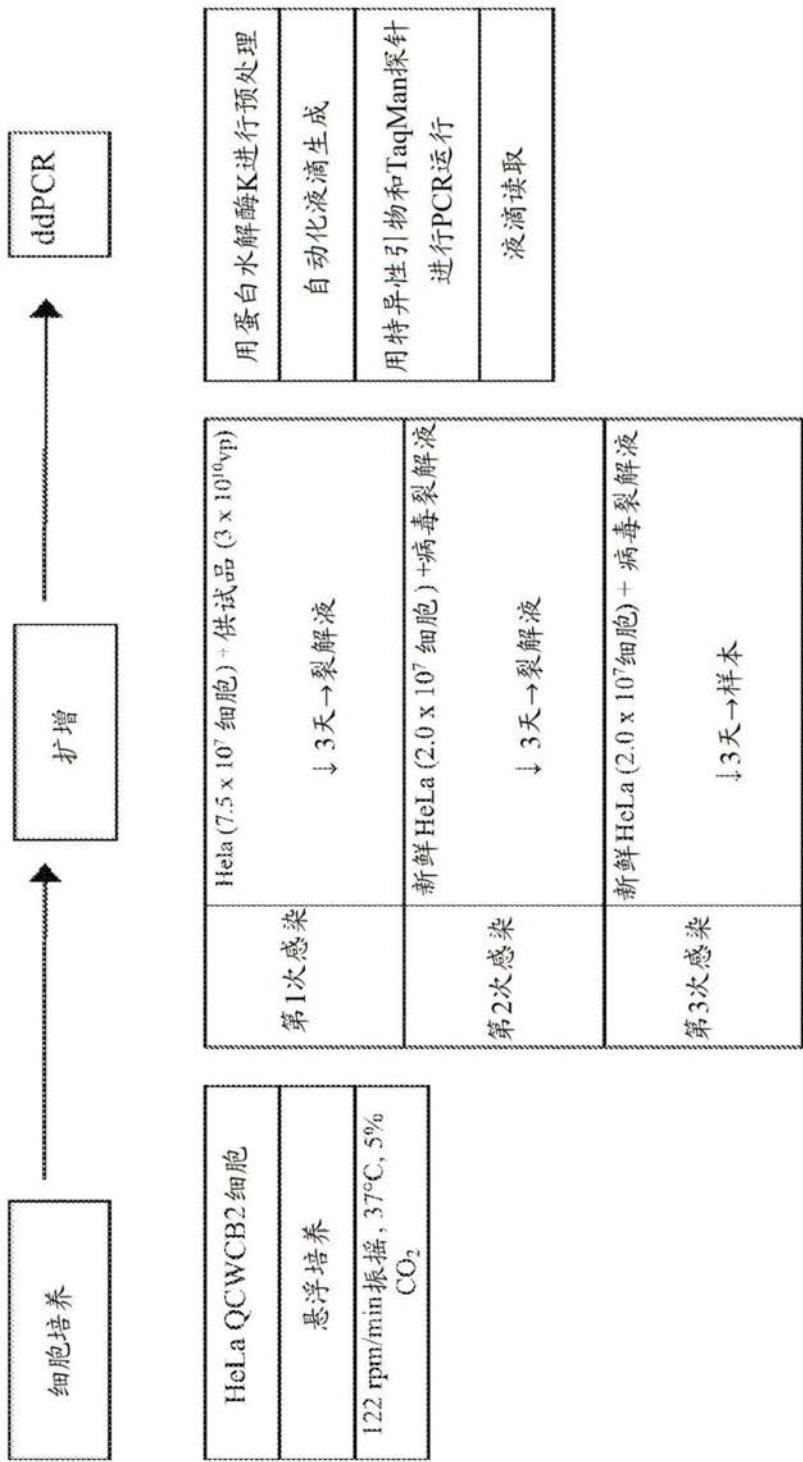


图 1

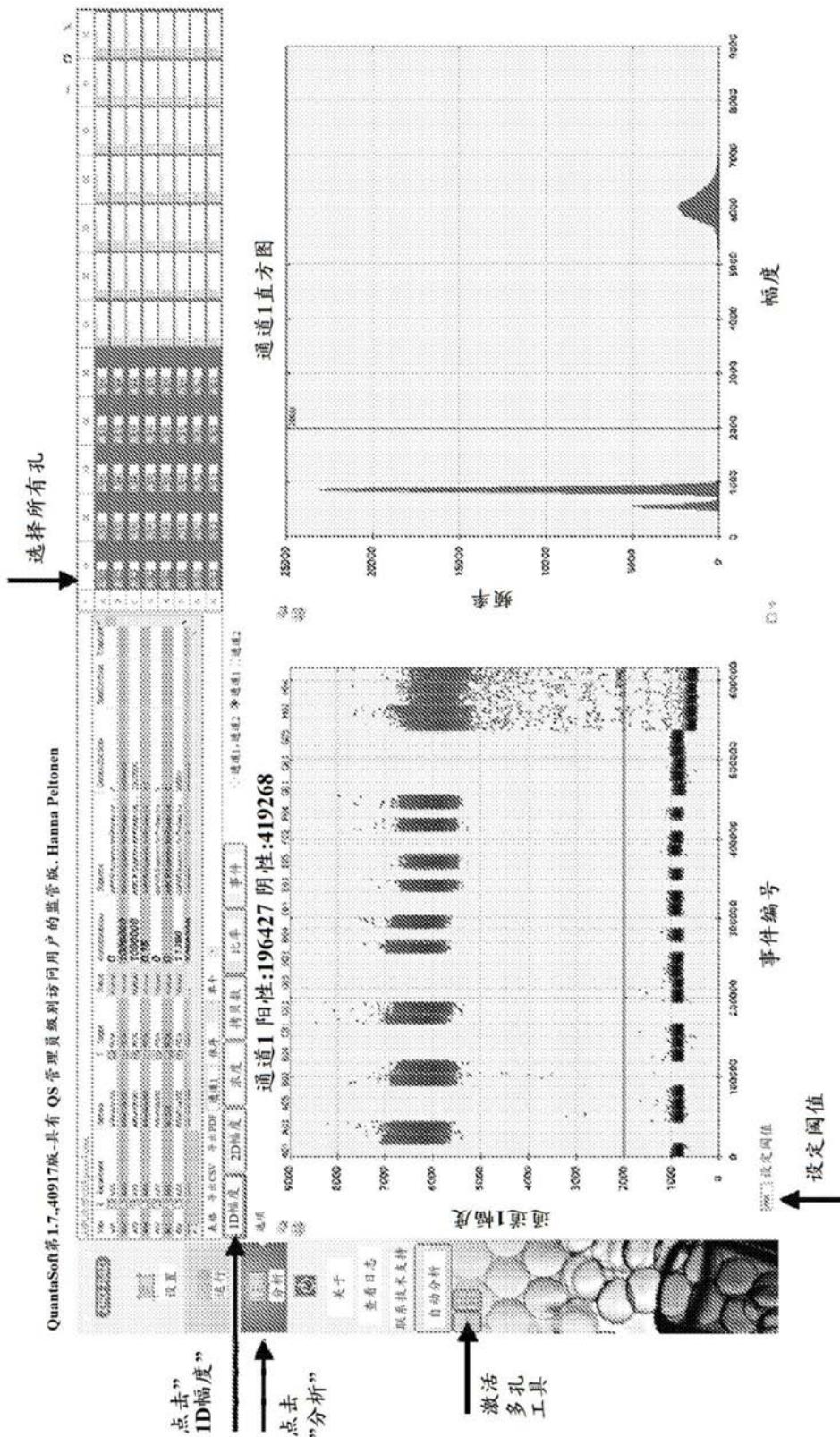


图2