



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116710567 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 05

(21) 申请号 202180078052.9

(22) 申请日 2021.10.15

(30) 优先权数据

63/092,179 2020.10.15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.05.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/055243 2021.10.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/082017 EN 2022.04.21

(71) 申请人 普利维尔治疗公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 戴勇 周敬民 加勒特·丹尼尔斯

乔纳森·陈 豪尔赫·哈勒

斯图尔特·尼尔森

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

专利代理师 金海霞 刘慧

(51) Int.Cl.

C12N 15/87 (2006.01)

权利要求书4页 说明书58页

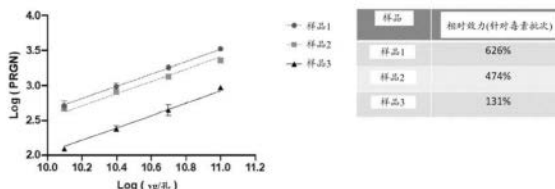
序列表9页 附图3页

(54) 发明名称

重组腺相关病毒组合物及其产生方法

(57) 摘要

本文公开了包含重组腺相关病毒(rAAV)的组合物,以及重组杆状病毒系统和使用所述系统产生和纯化此类组合物的方法。本文还公开了用于测试此类组合物的滴度和效力的测定。



1. 一种用于产生细胞溶解产物的方法,所述方法包括:
 - (i) 获得含有悬浮于包含两种或更多种无血清和/或无蛋白质昆虫细胞培养基的混合物中的昆虫细胞的生物反应器;
 - (ii) 用第一杆状病毒载体群体以介于约1.0与2.0之间的感染复数(MOI)感染所述昆虫细胞,其中所述第一杆状病毒载体群体包含编码所关注的基因产物的表达盒;
 - (iii) 用一个或多个额外杆状病毒载体群体以介于约1.0与2.0之间的MOI感染所述昆虫细胞,其中所述额外群体各自包含编码AAV Rep蛋白和/或AAV Cap蛋白的表达盒;
 - (iv) 在所述受感染的昆虫细胞产生编码所关注的所述基因的重组腺相关病毒(rAAV)颗粒的条件下培养所述受感染的昆虫细胞;以及
 - (v) 使所述受感染的昆虫细胞溶解以产生包含所述rAAV颗粒的细胞溶解产物。
2. 如权利要求1所述的方法,其中所述两种或更多种无血清和/或无蛋白质昆虫培养基中的每一者选自4Cell Insect CD培养基、ESF-921、ESF-AF、ExpiSf CD培养基、Express Five SFM、baculoGROW、IS SF和SF900 IISFM。
3. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述混合物包含约10%v/v至约50%v/v的SF900 IISFM培养基。
4. 如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中在原株扩种4-6代后获得(i)的所述昆虫细胞。
5. 如权利要求1至4中任一项所述的方法,其中(ii)的所述感染和(iii)的所述感染同时发生。
6. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述昆虫细胞以介于 $8E+06$ 个活细胞/毫升(vc/mL)至约 $20E+06$ vc/mL之间的细胞密度存在于所述生物反应器中。
7. 如权利要求1至6中任一项所述的方法,其中(iv)的所述培养在1天与5天之间持续发生。
8. 如权利要求1至7中任一项所述的方法,其中(v)的所述溶解包括使所述受感染的昆虫细胞与去垢剂接触。
9. 如权利要求1至8中任一项所述的方法,所述方法还包括通过深度过滤使所述细胞溶解产物澄清的步骤。
10. 如权利要求1至9中任一项所述的方法,所述方法还包括通过切向流过滤和/或透滤来浓缩所述溶解产物中的所述rAAV颗粒的步骤。
11. 如权利要求1至10中任一项所述的方法,其中所关注的所述基因产物包括肽、多肽、抑制性核酸或它们的组合。
12. 如权利要求11所述的方法,其中所关注的所述基因产物包括葡糖脑苷脂酶(GCase)、颗粒蛋白前体(PGRN)、鞘脂激活蛋白原(PSAP)、C9orf72、在髓样细胞上表达的触发受体2(TREM2)、载脂蛋白E2(ApoE2)或帕金森蛋白。
13. 如权利要求1至12中任一项所述的方法,其中所述rAAV颗粒包含AAV衣壳蛋白,所述AAV衣壳蛋白是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9或前述任一者的变体。
14. 如权利要求1至13中任一项所述的方法,其中所述细胞溶解产物包含
 - (a) 约 $1E+11$ 个病毒基因组/毫升(vg/mL)至约 $1.0E+13$ vg/mL;
 - (b) 约 $2E+11$ vg/mL至约 $1.0E+13$ vg/mL;或

(c) 约 $5E+11$ vg/mL至约 $1.0E+13$ vg/mL。

15. 一种药物组合物,所述药物组合物包含通过如权利要求1至14中任一项所述的方法产生的细胞溶解产物。

16. 如权利要求15所述的药物组合物,所述药物组合物还包含冷冻保护剂。

17. 一种用于产生治疗性组合物的方法,所述方法包括:

(i) 获得包含rAAV颗粒的细胞溶解产物;

(ii) 使亲和色谱柱与所述细胞溶解产物接触,其中所述亲和柱包含在所述rAAV颗粒结合至所述亲和色谱柱的条件下对所述rAAV颗粒的衣壳蛋白具有特异性的结合剂;

(iii) 从所述柱上洗脱所述结合的rAAV颗粒,从而产生第一洗脱液;

(iv) 对所述第一洗脱液进行阴离子交换色谱以产生第二洗脱液,其中所述第二洗脱液包含比所述第一洗脱液更少的空rAAV颗粒;

(v) 通过使用包含Tris、 $MgCl_2$ 、NaCl和泊洛沙姆188的流动缓冲液进行切向流过滤来浓缩所述第二洗脱液,从而产生包含rAAV颗粒的治疗性组合物。

18. 如权利要求17所述的方法,其中(i)的所述细胞溶解产物通过如权利要求1至14中任一项所述的方法获得。

19. 如权利要求17或18所述的方法,其中所述结合剂包含对AAV9衣壳蛋白具有特异性的亲和树脂。

20. 如权利要求17至19中任一项所述的方法,其中所述阴离子交换色谱包括将所述第一洗脱液与平衡缓冲液混合以产生具有介于约 0.5 mS/cm至 5 mS/cm之间的电导率的混合物,任选地其中所述混合物具有 2 mS/cm的电导率,使所述混合物结合至含季胺的树脂以使所述混合物中的所述rAAV颗粒结合至所述树脂,以及从所述树脂上洗脱所述rAAV颗粒以产生所述第二洗脱液。

21. 如权利要求17至20中任一项所述的方法,其中将所述第二洗脱液从约 $1.0E+12$ vg/mL浓缩至约 $1E+14$ vg/mL。

22. 如权利要求17至21中任一项所述的方法,其中所述治疗性组合物包含约 $1E+13$ vg/mL至约 $1E+14$ vg/mL。

23. 如权利要求17至22中任一项所述的方法,其中所述治疗性组合物包含小于约15%的空rAAV颗粒。

24. 一种包含rAAV颗粒的治疗性组合物,其中所述rAAV颗粒包含AAV衣壳蛋白和编码所关注的基因产物的表达盒,其中所述治疗性组合物包含大于约 $1E+13$ vg/mL的rAAV颗粒,并且其中所述治疗性组合物包含小于约15%的空rAAV颗粒。

25. 如权利要求24所述的治疗性组合物,其中所关注的所述基因产物包括肽、多肽、抑制性核酸或它们的组合。

26. 如权利要求25所述的治疗性组合物,其中所关注的所述基因产物包括GCCase、GRN、PSAP、TREM2、ApoE2或帕金森蛋白。

27. 如权利要求24-26中任一项所述的治疗性组合物,其中所述rAAV颗粒包含AAV衣壳蛋白,所述AAV衣壳蛋白是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9或前述任一者的变体。

28. 如权利要求24-27中任一项所述的治疗性组合物,其中所述治疗性组合物包含约 $1E$

+13vg/mL至约1E+14vg/mL。

29. 如权利要求24-28中任一项所述的治疗性组合物,其中所述治疗性组合物是在容器中。

30. 如权利要求24-29中任一项所述的治疗性组合物,其中所述治疗性组合物是无菌的。

31. 如权利要求30所述的治疗性组合物,其中所述治疗性组合物不促进微生物生长。

32. 如权利要求24至31中任一项所述的治疗性组合物,其中所述治疗性组合物包含小于约0.5EU/mL的内毒素水平。

33. 如权利要求24至32中任一项所述的治疗性组合物,其中所述rAAV颗粒包含AAV9衣壳蛋白。

34. 如权利要求24至33中任一项所述的治疗性组合物,其中大于约1.0E+13vg/mL的所述rAAV包含所述基因产物。

35. 如权利要求24至34中任一项所述的治疗性组合物,其中所述rAAV的TCID₅₀滴度为约1,000vg/IU至约6,000vg/IU。

36. 如权利要求24至35中任一项所述的治疗性组合物,其中所述基因产物是GC_{ase}。

37. 如权利要求36所述的治疗性组合物,其中GC_{ase}活性至少为相对于参考标准的110%,其中所述参考标准是编码GC_{ase}的纯化的rAAV。

38. 如权利要求24至37中任一项所述的治疗性组合物,其中感染滴度为约8.0E+9IU/mL至约1.2E+10IU/mL。

39. 如权利要求24至38中任一项所述的治疗性组合物,其中渗透压介于约300mOsm/kg与约500mOsm/kg之间。

40. 如权利要求24至39中任一项所述的治疗性组合物,其中pH介于约7与约9之间。

41. 如权利要求24至40中任一项所述的治疗性组合物,其中所述治疗性组合物不含可见颗粒。

42. 如权利要求24至41中任一项所述的治疗性组合物,其中所述治疗性组合物包含每个容器少于约6000个大于约10 μ m的颗粒,以及每个容器少于约600个大于约25 μ m的颗粒。

43. 如权利要求24至42中任一项所述的治疗性组合物,其中所述治疗性组合物包含小于或等于约3%的聚集体。

44. 如权利要求24至43中任一项所述的治疗性组合物,其中所述治疗性组合物包含约300 μ g/mL至约1000 μ g/mL的总蛋白水平。

45. 如权利要求24至44中任一项所述的治疗性组合物,其中所述rAAV的纯度大于约90%v/v。

46. 如权利要求45所述的治疗性组合物,其中所述治疗性组合物不包含大于约5%v/v的任何单一杂质。

47. 如权利要求24至46中任一项所述的治疗性组合物,其中所述治疗性组合物包含约0.0007%至约0.0012%的普朗尼克。

48. 如权利要求24至47中任一项所述的治疗性组合物,其中所述治疗性组合物包含小于约5.5x 10⁴个拷贝RNA/mL的弹状病毒。

49. 如权利要求24至48中任一项所述的治疗性组合物,其中所述容器中所述治疗性组

合物的可提取体积等于或大于约1.0mL。

重组腺相关病毒组合物及其产生方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年10月15日提交的美国临时专利申请号63/092,179的权益,所述临时专利申请的公开内容特此以全文引用的方式并入。

[0003] 以电子方式提交的文本文件的描述

[0004] 随本文以电子方式提交的文本文件的内容以全文引用的方式并入本文中:序列表的计算机可读格式副本(文件名:PRVL_013_01W0_SeqList_ST25.txt,记录日期:2021年10月15日,文件大小约16,966字节)。

技术领域

[0005] 本公开一般涉及基因疗法领域。更具体地,本公开提供了一种重组杆状病毒系统和使用所述系统产生包含重组腺相关病毒的组合物的方法。

背景技术

[0006] 重组腺相关病毒(rAAV)已经广泛地用作基因疗法的载体。非人类灵长类动物研究、人类临床试验和医学治疗对rAAV的需求不断增长。重组杆状病毒系统已经用于产生rAAV。仍然需要基于杆状病毒的过程,所述过程产生高产率的rAAV,并且提高纯度以适用于基因疗法方案。

发明内容

[0007] 本文提供了一种用于产生细胞溶解产物的方法,所述方法包括:(i)获得含有悬浮于包含两种或更多种无血清和/或无蛋白质昆虫细胞培养基的混合物中的昆虫细胞的生物反应器;(ii)用第一杆状病毒载体群体以介于约1.0与2.0之间的感染复数(MOI)感染昆虫细胞,其中所述第一杆状病毒载体群体包含编码所关注的基因产物的表达盒;(iii)用一个或多个额外杆状病毒载体群体以介于约1.0与2.0之间的MOI感染昆虫细胞,其中所述额外群体各自包含编码AAV Rep蛋白和/或AAV Cap蛋白的表达盒;(iv)在受感染的昆虫细胞产生编码所关注的基因的rAAV颗粒的条件下培养受感染的昆虫细胞;以及(v)使受感染的昆虫细胞溶解以产生包含rAAV颗粒的细胞溶解产物。在一些实施方案中,两种或更多种无血清和/或无蛋白质昆虫培养基中的每一者选自4Cell Insect CD培养基、ESF-921、ESF-AF、ExpiSf CD培养基、Express Five SFM、baculoGROW、IS SF和SF900 II SFM。在一些实施方案中,混合物包含约10%v/v至约50%v/v的SF900 II SFM培养基。

[0008] 在一些实施方案中,在原株扩种(master seed train)4-6代后获得步骤(i)的昆虫细胞。在一些实施方案中,步骤(ii)的感染和步骤(iii)的感染同时发生。

[0009] 在一些实施方案中,昆虫细胞以介于 $8E+06$ 个活细胞/毫升(vc/mL)至约 $20E+06$ vc/mL之间的细胞密度存在于生物反应器中。

[0010] 在一些实施方案中,步骤(iv)的培养在1天与5天之间持续发生。在一些实施方案中,步骤(v)的溶解包括使受感染的昆虫细胞与去垢剂接触。

[0011] 在一些实施方案中,用于产生细胞溶解产物的方法还包括通过深度过滤使细胞溶解产物澄清的步骤。在一些实施方案中,用于产生细胞溶解产物的方法还包括通过切向流过滤和/或透滤来浓缩溶解产物中的rAAV颗粒的步骤。

[0012] 在一些实施方案中,所关注的基因产物包括肽、多肽、抑制性核酸或它们的组合。在一些实施方案中,所关注的基因产物包括葡糖脑苷脂酶(GCase)、颗粒蛋白前体(progranulin,PGRN)、鞘脂激活蛋白原(prosaposin,PSAP)、C9orf72、在髓样细胞上表达的触发受体2(TREM2)、载脂蛋白E2(ApoE2)或帕金森蛋白(parkin)。

[0013] 在一些实施方案中,细胞溶解产物包含rAAV颗粒,所述rAAV颗粒包含AAV衣壳蛋白,所述AAV衣壳蛋白是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9或前述任一者的变体。

[0014] 在一些实施方案中,细胞溶解产物包含(a)约 $1E+11$ 个病毒基因组/毫升(vg/mL)至约 $1.0E+13$ vg/mL;(b)约 $2E+11$ vg/mL至约 $1.0E+13$ vg/mL;或(c)约 $5E+11$ vg/mL至约 $1.0E+13$ vg/mL。

[0015] 本文提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含通过本文所公开的方法中的任一者产生的细胞溶解产物。在一些实施方案中,组合物还包含冷冻保护剂。

[0016] 本文提供了一种用于产生治疗性组合物的方法,所述方法包括:(i)获得包含rAAV颗粒的细胞溶解产物;(ii)使亲和色谱柱与细胞溶解产物接触,其中所述亲和柱包含在rAAV颗粒结合至亲和色谱柱的条件下对rAAV颗粒的衣壳蛋白具有特异性的结合剂;(iii)从柱上洗脱结合的rAAV颗粒,从而产生第一洗脱液;(iv)对第一洗脱液进行阴离子交换色谱以产生第二洗脱液,其中所述第二洗脱液包含比第一洗脱液更少的空rAAV颗粒;(v)通过使用包含Tris、 $MgCl_2$ 、NaCl和泊洛沙姆188(Poloxamer 188)的流动缓冲液进行切向流过滤来浓缩第二洗脱液,从而产生包含rAAV颗粒的治疗性组合物。在一些实施方案中,通过本文所公开的用于产生细胞溶解产物的方法中的任一者来获得步骤(i)的细胞溶解产物。在一些实施方案中,结合剂包含对AAV9衣壳蛋白具有特异性的亲和树脂。

[0017] 在一些实施方案中,阴离子交换色谱包括将第一洗脱液与平衡缓冲液混合以产生具有介于约 $0.5mS/cm$ 至 $5mS/cm$ 之间的电导率的混合物,任选地其中所述混合物具有 $2mS/cm$ 的电导率,使混合物结合至含季胺的树脂以使混合物中的rAAV颗粒结合至树脂,以及从树脂上洗脱rAAV颗粒以产生第二洗脱液。

[0018] 在一些实施方案中,将第二洗脱液从约 $1.0E+12$ vg/mL浓缩至约 $1E+14$ vg/mL。在一些实施方案中,治疗性组合物包含约 $1E+13$ vg/mL至约 $1E+14$ vg/mL。在一些实施方案中,治疗性组合物包含小于约15%的空rAAV颗粒。

[0019] 本文提供了一种包含rAAV颗粒的治疗性组合物,其中所述rAAV颗粒包含AAV衣壳蛋白和编码所关注的基因产物的表达盒,其中所述治疗性组合物包含大于约 $1E+13$ vg/mL的rAAV颗粒,并且其中所述治疗性组合物包含小于约15%的空rAAV颗粒。在一些实施方案中,所关注的基因产物包括肽、多肽、抑制性核酸或它们的组合。在一些实施方案中,所关注的基因产物包括GCase、GRN、PSAP、TREM2、ApoE2或帕金森蛋白。在一些实施方案中,rAAV颗粒包含AAV衣壳蛋白,所述AAV衣壳蛋白是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9或前述任一者的变体。

[0020] 在一些实施方案中,治疗性组合物包含约 $1E+13$ vg/mL至约 $1E+14$ vg/mL。

[0021] 在一些实施方案中,治疗性组合物在容器中。在一些实施方案中,治疗性组合物是无菌的。在一些实施方案中,治疗性组合物不促进微生物生长。在一些实施方案中,治疗性组合物包含小于约0.5EU/mL的内毒素水平。

[0022] 在一些实施方案中,rAAV颗粒包含AAV9衣壳蛋白。

[0023] 在一些实施方案中,大于约 $1.0E+13$ vg/mL的rAAV包含基因产物。在一些实施方案中,rAAV的TCID₅₀滴度为约1,000vg/IU至约6,000vg/IU。

[0024] 在一些实施方案中,基因产物是GCCase。在一些实施方案中,GCCase活性至少为相对于参考标准的110%,其中所述参考标准是编码GCCase的纯化的rAAV。

[0025] 在一些实施方案中,感染滴度为约 $8.0E+9$ IU/mL至约 $1.2E+10$ IU/mL。

[0026] 在一些实施方案中,渗透压介于约300mOsm/kg与约500mOsm/kg之间。在一些实施方案中,pH介于约7与约9之间。

[0027] 在一些实施方案中,治疗性组合物不含可见颗粒。在一些实施方案中,治疗性组合物包含每个容器少于约6000个大于约10 μ m的颗粒,以及每个容器少于约600个大于约25 μ m的颗粒。在一些实施方案中,治疗性组合物包含小于或等于约3%的聚集体。

[0028] 在一些实施方案中,治疗性组合物包含约300 μ g/mL至约1000 μ g/mL的总蛋白水平。

[0029] 在一些实施方案中,rAAV的纯度大于约90%v/v。

[0030] 在一些实施方案中,治疗性组合物不包含大于约5%v/v的任何单一杂质。在一些实施方案中,治疗性组合物包含约0.0007%至约0.0012%的普朗尼克(Pluronic)。在一些实施方案中,治疗性组合物包含小于约 5.5×10^4 个拷贝RNA/mL的弹状病毒。

[0031] 在一些实施方案中,容器中治疗性组合物的可提取体积等于或大于约1.0mL。

附图说明

[0032] 图1是用于rAAV效力测定的PCR板块图的图表。“RS”是指“参考标准”。“TS”是指“测试样品”。

[0033] 图2描绘了表达GCCase的几种rAAV样品的相对效力的线图和计算。

[0034] 图3描绘了表达PGRN的几种rAAV样品的相对效力的线图和计算。

具体实施方式

[0035] 本公开涉及包含具有高产率和足够纯度的rAAV的药物组合物,所述药物组合物适用于在基因疗法方案中施用。本公开还涉及使用重组杆状病毒系统以产生包含具有高产率和高纯度的rAAV的组合物的方法。

[0036] 术语“重组病毒”是指已经遗传改变的病毒,例如,通过将异源核酸构建体添加至或插入病毒颗粒中。

[0037] 术语“异源”在本文中与术语“外源”可互换使用,并且是指来自除其天然来源以外的某种来源的物质。举例来说,术语“外源蛋白”或“外源基因”是指来自非AAV来源的蛋白质或基因,所述蛋白质或基因已经人工引入AAV基因组或AAV颗粒中。

[0038] 术语“重组腺相关病毒”或“rAAV”是指包含被一种或多种AAV衣壳蛋白包裹的rAAV载体的AAV颗粒或AAV病毒体。

[0039] 术语“rAAV载体”是指单链或双链核酸,所述核酸具有侧接蛋白质编码序列的AAV

5'反向末端重复(ITR)序列和AAV 3' ITR,所述蛋白质编码序列可操作地连接至与AAV病毒基因组异源的转录调控元件,例如,一个或多个启动子和/或增强子,以及任选地,聚腺苷酸化序列和/或一个或多个插入蛋白质编码序列外显子之间的内含子。

[0040] 术语“全rAAV颗粒”或“全rAAV衣壳”是指包含AAV结构蛋白外壳的AAV病毒体,所述外壳包裹核酸分子,所述核酸分子包含两侧由AAV ITR侧接的所关注的外源基因。

[0041] 术语“空rAAV颗粒”或“空rAAV衣壳”是指包含AAV结构蛋白外壳,但缺乏全部或部分多核苷酸构建体的AAV病毒体,所述多核苷酸构建体包含两侧由AAV ITR侧接的所关注的外源基因。空rAAV颗粒不能将所关注的基因转移至宿主细胞中。

[0042] 在一些实施方案中,术语“洗脱液”是指用于洗脱物质的缓冲液。在一些实施方案中,术语“洗脱液”在上下文中可以理解为指代洗脱的物质,例如来自先前纯化步骤的所需产物或物质,例如用于测定或进一步纯化。

[0043] 术语“参考标准”是指包含编码所关注的外源蛋白的AAV载体的组合物,所述组合物的浓度和/或效力是已知的。

[0044] 术语“IU”是指感染单位。

[0045] 术语“TCID50”是指50%的细胞培养感染剂量。

[0046] 术语“USP”是指美国药典。

[0047] 包含重组腺相关病毒的治疗性组合物

[0048] 本文提供了包含rAAV的治疗性组合物。在一些方面,本文所提供的治疗性组合物适用于基因疗法。

[0049] 在一些方面,本文提供了一种包含rAAV颗粒的治疗性组合物,其中所述rAAV颗粒包含AAV衣壳蛋白和编码所关注的基因产物的表达盒,其中所述治疗性组合物包含大于 $1E+13$ vg/mL的rAAV颗粒,并且其中所述治疗性组合物包含小于15%的空rAAV颗粒。

[0050] 在一些实施方案中,所关注的基因产物包括肽、多肽、抑制性核酸或它们的组合。

[0051] 在一些实施方案中,所关注的基因产物是人类GCCase或人类颗粒蛋白前体(PGRN或GRN)。在一些实施方案中,所关注的基因产物是人类PSAP、人类C9orf72、人类TREM2、人类ApoE2或人类帕金森蛋白。

[0052] 在一些实施方案中,抑制性核酸是抑制性RNA。在一些实施方案中,抑制性核酸是双链RNA(dsRNA)、siRNA、微小RNA(miRNA)、人工miRNA(amiRNA)、短发夹RNA(shRNA)或RNA适体。可以通过修饰天然miRNA以用所关注的靶向区域置换pre-mRNA的天然靶向区域来获得人工微小RNA(amiRNA)。举例来说,天然存在的表达的miRNA可以用作支架或主链(例如,pri-miRNA支架),其中茎序列被靶向所关注基因的miRNA的序列置换。通常对人工前体微小RNA(pre-amiRNA)进行加工,以便优先产生一个单一稳定的小RNA。在一些实施方案中,本文所描述的scAAV载体和scAAV包含编码amiRNA的核酸。在一些实施方案中,amiRNA的pri-miRNA支架来源于选自由以下组成的组的pri-miRNA:pri-MIR-21、pri-MIR-22、pri-MIR-26a、pri-MIR-30a、pri-MIR-33、pri-MIR-122、pri-MIR-375、pri-MIR-199、pri-MIR-99、pri-MIR-194、pri-MIR-155和pri-MIR-451。在一些实施方案中,amiRNA包含eSIBR amiRNA支架,例如,如Fowler等(2016)Nucleic Acids Res.44(5):e48中所描述。在一些实施方案中,amiRNA包含miR-7-2支架。

[0053] 在一些实施方案中,抑制性RNA靶向人类 α -突触核蛋白、人类共济失调蛋白2

(ATXN2)、人类微管相关蛋白tau(MAPT)或人类载脂蛋白E(ApoE)。在一些实施方案中,rAAV载体包含编码人类GCCase的多核苷酸(例如,SEQ ID NO:2)和编码靶向人类 α -突触核蛋白的抑制性RNA的多核苷酸。在一些实施方案中,编码靶向人类 α -突触核蛋白的抑制性RNA的多核苷酸包含SEQ ID NO:12。在一些实施方案中,rAAV载体包含编码人类C9orf72(即,功能性C9orf72)的多核苷酸和编码靶向人类C9orf72的抑制性RNA的多核苷酸。在一些实施方案中,rAAV载体包含编码人类ApoE2(即,功能性ApoE2)的多核苷酸和编码靶向人类ApoE的抑制性RNA的多核苷酸。在一些实施方案中,单个核酸分子包含编码外源蛋白的多核苷酸和编码抑制性RNA的多核苷酸。在一些实施方案中,rAAV载体包含编码人类TREM2(即,功能性TREM2)的多核苷酸和编码靶向人类TREM2的抑制性RNA的多核苷酸。

[0054] 可以用于本文所公开的组合物和方法中的适合的rAAV载体的实例在W02019/070891、W02019/070893、W02019/070894和W02019/084068中公开,每篇文献的公开内容以全文引用的方式并入本文中。

[0055] 在本文所公开的治疗性组合物的一些实施方案中,rAAV载体还包含以下一者或多者:鸡 β 肌动蛋白(CBA)启动子;巨细胞病毒(CMV)增强子;土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE);牛生长激素polyA信号尾;人工内含子;人工外显子;以及启动子区域中的一个或多个以下转录调控激活位点:TATA、RBS和YY1(Francois等(2005) *J. Virol.* 79(17):11082-11094)。TATA、RBS和YY1转录调控激活位点可以位于启动子区域的5'端。

[0056] 在本文所公开的治疗性组合物的一些实施方案中,rAAV载体包含侧接编码所关注的基因产物和相关调控序列的多核苷酸的第一AAV反向末端重复(ITR)和第二ITR。在一些实施方案中,每个ITR是野生型AAV2 ITR(SEQ ID NO:5)。在一些实施方案中,每个ITR来源于野生型AAV2 ITR。

[0057] 在本文所公开的治疗性组合物的一些实施方案中,rAAV载体按顺序包含第一AAV ITR、CMV增强子、CBA启动子、编码人类GCCase蛋白的多核苷酸、WPRE、牛生长激素polyA信号尾和第二AAV ITR。在一些实施方案中,对编码人类GCCase蛋白的多核苷酸进行密码子优化(例如,针对在人类细胞中的表达进行密码子优化)。在一些实施方案中,编码人类GCCase蛋白的多核苷酸包含SEQ ID NO:2。

[0058] 在本文所公开的治疗性组合物的一些实施方案中,rAAV载体按顺序包含第一AAV ITR、CMV增强子、CBA启动子、编码人类PGRN蛋白的多核苷酸、WPRE、牛生长激素polyA信号尾和第二AAV ITR。在一些实施方案中,对编码人类PGRN蛋白的多核苷酸进行密码子优化(例如,针对在人类细胞中的表达进行密码子优化)。在一些实施方案中,编码人类PGRN蛋白的多核苷酸包含SEQ ID NO:4。

[0059] 在本文所公开的治疗性组合物的一些实施方案中,rAAV载体是自身互补的重组腺相关病毒(scAAV)载体。scAAV载体在例如McCarty等(2001) *Gene Ther.* 8(16):1248-54中描述。

[0060] 在本文所公开的治疗性组合物的一些实施方案中,rAAV包含AAV9衣壳蛋白。在本文所公开的组合物的一些实施方案中,rAAV包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10或AAV11衣壳蛋白,或这些衣壳蛋白中任一者的变体。

[0061] rAAV载体,例如本文所公开的组合物和制剂中的那些载体的基因组滴度(也称作物理滴度)可以用许多方式确定。使用对病毒载体具有特异性的引物的PCR可以提供相对测

量。定量PCR(qPCR)可以用于较小样品和绝对测量。液滴数字PCR(ddPCR)是一种基于水油乳液液滴技术进行数字PCR的方法。样品分成数万个液滴,并且模板分子的PCR扩增在每个单独的液滴中发生。不需要制作标准曲线或具有高扩增效率的引物,因此ddPCR通常不像传统的基于PCR的技术那样使用那么多的样品。在一些实施方案中,使用PCR确定病毒载体的基因组滴度。在一些实施方案中,使用qPCR确定病毒载体的基因组滴度。在一些实施方案中,使用ddPCR确定病毒载体的基因组滴度。一种使用ddPCR确定病毒基因组滴度的方法在例如Lock等(2014)Hum Gene Ther Methods 25(2):115-25中描述。在一些实施方案中,使用实施例11或实施例13中所提供的方法确定病毒载体的基因组滴度。在一些实施方案中,治疗性组合物的物理滴度大于或等于约 2.0×10^{13} vg/mL、约 3.0×10^{13} vg/mL、约 4.0×10^{13} vg/mL或约 5.0×10^{13} vg/mL。在一些实施方案中,治疗性组合物的物理滴度为约 2.0×10^{13} vg/mL至约 5.0×10^{13} vg/mL。在一些实施方案中,治疗性组合物包含大于 1×10^{13} vg/mL的rAAV颗粒。在一些实施方案中,治疗性组合物包含约 1×10^{13} vg/mL至约 1×10^{14} vg/mL的rAAV颗粒。

[0062] rAAV载体,例如本文所公开的组合物和制剂中的那些载体的感染滴度(也称作功能滴度)是可以感染细胞的病毒颗粒的浓度。在一些实施方案中,通过细胞转导测定来确定感染滴度。在一些实施方案中,使用实施例12或实施例14中所提供的方法确定病毒载体的感染滴度。在一些实施方案中,本文所公开的组合物的感染滴度为约 8.0×10^9 IU/mL至约 1.2×10^{10} IU/mL。在一些实施方案中,本文所公开的组合物的感染滴度为约 8.0×10^9 IU/mL、约 8.15×10^9 IU/mL、约 8.5×10^9 IU/mL、约 9.0×10^9 IU/mL、约 9.5×10^9 IU/mL、约 9.99×10^9 IU/mL、约 1×10^{10} IU/mL、约 1.12×10^{10} IU/mL或约 1.2×10^{10} IU/mL。在一些实施方案中,本文所公开的组合物的TCID₅₀为约4,500vg/IU至约10,000vg/IU。在一些实施方案中,本文所公开的组合物的TCID₅₀为约1,000vg/IU至约6,000vg/IU。在一些实施方案中,本文所公开的组合物的TCID₅₀为约4,500vg/IU、约5,000vg/IU、约5,500vg/IU、约6,000vg/IU、约6,290vg/IU、约6,500vg/IU、约7,000vg/IU、约7,500vg/IU、约8,000vg/IU、约8,500vg/IU、约9,000vg/IU、约9,500vg/IU、约9,980vg/IU或约10,000vg/IU。

[0063] 在一些实施方案中,基于PCR的方法使用专门设计的引物和靶向外源基因的探针来检测和定量衣壳化rAAV基因组。在一些实施方案中,基于PCR的方法使用专门设计的引物和靶向CBA启动子的探针来检测和定量衣壳化rAAV基因组。在一些实施方案中,基于PCR的方法使用专门设计的引物和靶向CMV增强子的探针来检测和定量衣壳化rAAV基因组。在一些实施方案中,基于PCR的方法使用专门设计的引物和靶向ITR序列的探针来检测和定量衣壳化rAAV基因组。在一些实施方案中,基于PCR的方法使用专门设计的引物和靶向牛生长激素聚腺苷酸化(polyA)信号尾的探针来检测和定量衣壳化rAAV基因组。

[0064] 在一些情况下,在含有rAAV的组合物的产生过程中,可能产生包含杂质的组合物。包含少量杂质的药物组合物可能是有利的,因为这些组合物避免使免疫系统不成熟或受损的受试者(例如,婴儿)不必要地暴露于抗原材料(例如,空衣壳、宿主细胞蛋白、宿主细胞DNA)而没有治疗益处。在一些实施方案中,此类药物组合物可以减少潜在的输液反应或更广泛的免疫反应并且可以提高治疗功效。

[0065] 在一些实施方案中,在AAV产生过程中可能产生不含核酸材料的空rAAV颗粒(也称作“空衣壳”)。与具有rAAV载体材料的全病毒颗粒相比,空颗粒具有不同的密度,从而允许通过本领域中已知的方法分离两个种类。在一些实施方案中,通过色谱(例如整体色谱,或

更具体地,对流相互作用介质整体色谱)分离空衣壳。

[0066] 在一些实施方案中,可以通过标准实验室技术测量空rAAV颗粒与全rAAV颗粒的比率。在一些实施方案中,通过透射电子显微术(TEM)来测量比率。在一些实施方案中,通过光学吸光度测量来测量比率。在一些实施方案中,通过UV吸光度测量来测量比率。

[0067] 在一些实施方案中,本文所公开的治疗性组合物包含小于约15%的空rAAV颗粒。在一些实施方案中,治疗性组合物包含小于约10%、小于约8%的空rAAV颗粒、小于7%、小于约5%、小于约3%或小于约1%的空rAAV颗粒。在一些实施方案中,治疗性组合物包含约1%至约10%的空rAAV颗粒。在一些实施方案中,治疗性组合物包含约2%至约8%的空rAAV颗粒。在一些实施方案中,治疗性组合物包含小于或等于约6%的空rAAV颗粒、约5%的空rAAV颗粒、约4%的空rAAV颗粒、约3%的空rAAV颗粒、约2%的空rAAV颗粒或约1%的空rAAV颗粒。在一些实施方案中,空rAAV颗粒的数量低于检测限。在一些实施方案中,将空rAAV颗粒的百分比确定为总rAAV颗粒的百分比,例如,使用分析型超速离心(AUC)。在一些实施方案中,这些低百分比的空rAAV颗粒在向受试者施用后提高治疗功效和/或减少不良事件(例如,炎症反应、肝损伤),例如,与施用具有更高百分比的空rAAV颗粒的组合物相比。在一些实施方案中,与在其它方法中产生的空rAAV颗粒的水平,例如不使用本文所描述的产生和/或纯化方法的那些相比,本文所公开的制备rAAV组合物的方法提供了这些低百分比的空rAAV颗粒。

[0068] 在一些实施方案中,本文所公开的治疗性组合物包含至少80%的全rAAV颗粒。在一些实施方案中,治疗性组合物包含至少85%的全rAAV颗粒、至少90%的全rAAV颗粒或至少95%的全rAAV颗粒。

[0069] 在一些实施方案中,在rAAV组合物的产生过程中,来自用于产生rAAV颗粒的昆虫细胞(例如,Sf9细胞)的残留蛋白可能没有完全分离出。残留宿主细胞蛋白有可能在基因疗法受试者中引发免疫反应。可以通过任何可以区分病毒衣壳蛋白和残留宿主细胞蛋白的标准实验室技术来测量残留宿主细胞蛋白的量。在一些实施方案中,可以通过尺寸排阻或离子交换色谱来测量残留宿主细胞蛋白的量。在一些实施方案中,可以进行测量,可以通过使用亲本细胞特异性抗体的免疫印迹来测量残留宿主细胞蛋白的量。在一些实施方案中,可以通过酶联免疫吸附测定(ELISA)来测量残留宿主细胞蛋白的量。在一些实施方案中,可以通过商业ELISA试剂盒来测量残留宿主细胞蛋白的量。

[0070] 在一些实施方案中,本文所公开的治疗性组合物中的残留宿主细胞蛋白小于或等于约45ng/1E+13vg、42ng/1E+13vg、40ng/1E+13vg、35ng/1E+13vg、30ng/1E+13vg、约29ng/1E+13vg、约28ng/1E+13vg、约27ng/1E+13vg、约26ng/1E+13vg或约25ng/1E+13vg。

[0071] 在一些实施方案中,在rAAV组合物的产生过程中,来自用于产生rAAV载体的昆虫细胞(例如,Sf9细胞)的残留宿主细胞DNA或者残留杆状病毒DNA或杆粒DNA可能没有完全去除。纯化过程(例如,澄清、切向流过滤等)可能去除大部分残留宿主细胞DNA或杆状病毒DNA。在一些实施方案中,通过PCR(聚合酶链反应)进行残留宿主细胞或杆状病毒DNA的量的测量。在一些实施方案中,通过使用对宿主细胞或杆状病毒序列具有特异性的引物的qPCR进行残留宿主细胞或杆状病毒DNA的量的测量。在一些实施方案中,通过ddPCR进行残留宿主细胞或杆状病毒DNA的量的测量。在一些实施方案中,通过使用对杆粒的抗生素抗性基因区域具有特异性的引物的qPCR测定来确定杆状病毒或杆粒DNA的量。在一些实施方案中,通

过商业qPCR测定试剂盒来确定残留宿主细胞DNA的量。减少残留宿主细胞或杆状病毒或杆粒DNA的量可以改善治疗结果,并且可以纯化和/或选择此类组合物用于本文所公开的治疗。

[0072] 在一些实施方案中,本文所公开的药物组合物中残留宿主细胞DNA的量小于或等于每 $1E+14$ vg/ml约 $1E+03$ pg/ml。在一些实施方案中,药物组合物包含小于或等于每 $1E+14$ vg/mL约1.3ng残留宿主细胞蛋白。在一些实施方案中,本文所公开的药物组合物中残留宿主细胞DNA的量低于定量限。

[0073] 在一些实施方案中,包含本文所公开的病毒颗粒中的任一者的本文所公开的治疗性组合物保留介于参考标准 $\pm 20\%$ 之间、 $\pm 15\%$ 之间、 $\pm 10\%$ 之间或 $\pm 5\%$ 之间的效力。在一些实施方案中,本文所描述的治疗性组合物包含病毒载体,其中所述病毒载体的相对效力相对于参考标准为至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%、至少100%、至少110%、至少120%、至少130%或至少140%。在一些实施方案中,使用适合的体外细胞测定或体内动物模型来测量效力。在一些实施方案中,可以通过使用荧光底物试卤灵- β -D-吡喃葡萄糖苷的基于细胞的测定来确定编码人类GCCase的功能性rAAV的效力或%,如下文所描述。在一些实施方案中,可以通过使用ELISA的基于细胞的测定来确定编码人类颗粒蛋白前体的功能性rAAV的效力或%,如下文所描述。

[0074] 在一些实施方案中,本文所公开的治疗性组合物可以含有药学上可接受的辅助物质以接近生理条件,诸如pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂、润湿剂等,例如,乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、脱水山梨糖醇单月桂酸酯等。在一些实施方案中,药物组合物包含防腐剂。在一些实施方案中,药物组合物不包含防腐剂。

[0075] 可以配制本文所公开的rAAV组合物以制备药学上有用的组合物。可以使用本领域中已知的技术配制本公开的组合物用于向哺乳动物受试者(例如,人类)施用。在一些实施方案中,可以配制rAAV组合物用于注射至枕大池中。在一些实施方案中,可以配制rAAV组合物用于静脉内施用。在一些实施方案中,可以配制rAAV组合物用于肌内、皮内、粘膜、皮下、鞘内或局部施用。

[0076] 本文还提供了一种药物制剂,所述药物制剂包含:(a)包含含有编码人类GCCase蛋白的多核苷酸的rAAV载体的rAAV颗粒;(b) Tris缓冲液;(c)氯化镁;(d)氯化钠;以及(e)泊洛沙姆。在一些实施方案中,rAAV载体按顺序包含第一AAV ITR、CMV增强子、CBA启动子、编码人类GCCase蛋白的多核苷酸、WPRE、牛生长激素polyA信号尾和第二AAV ITR。在一些实施方案中,编码人类GCCase蛋白的多核苷酸包含SEQ ID NO:2。在一些实施方案中,包含含有编码人类GCCase蛋白的多核苷酸的rAAV载体的rAAV颗粒称作PR001。

[0077] 本文还提供了一种包含rAAV颗粒、约20mM Tris pH 8.0、约1mM氯化镁、约200mM氯化钠和约0.001%泊洛沙姆188的药物制剂,其中所述rAAV包含含有编码人类葡糖脑苷脂酶蛋白的核酸序列的rAAV载体,其中所述人类葡糖脑苷脂酶蛋白由SEQ ID NO:2的核苷酸序列编码;并且其中所述编码人类葡糖脑苷脂酶蛋白的核酸序列由两个AAV ITR序列侧接。在一些实施方案中,rAAV颗粒是AAV9颗粒。

[0078] 本文还提供了一种药物制剂,所述药物制剂包含:(a)包含含有编码人类颗粒蛋白前体(PGRN)蛋白的多核苷酸的rAAV载体的rAAV颗粒;(b) Tris缓冲液;(c)氯化镁;(d)氯化

钠;以及(e)泊洛沙姆。在一些实施方案中,rAAV载体按顺序包含第一AAV ITR、CMV增强子、CBA启动子、编码人类PGRN蛋白的多核苷酸、WPRE、牛生长激素polyA信号尾和第二AAV ITR。在一些实施方案中,编码人类PGRN蛋白的多核苷酸包含SEQ ID NO:4。在一些实施方案中,包含含有编码人类PGRN蛋白的多核苷酸的rAAV载体的rAAV颗粒称作PR006。

[0079] 本文还提供了一种包含rAAV颗粒、约20mM Tris pH 8.0、约1mM氯化镁、约200mM氯化钠和约0.001%泊洛沙姆188的药物制剂,其中所述rAAV包含含有编码人类葡糖脑苷脂酶的核酸序列的rAAV载体,其中所述人类颗粒蛋白前体蛋白由SEQ ID NO:4的核苷酸序列编码;并且其中所述编码人类颗粒蛋白前体蛋白的核酸序列由两个AAV ITR序列侧接。在一些实施方案中,rAAV颗粒是AAV9颗粒。

[0080] 在一些实施方案中,本文所公开的制剂包含约10mM至约30mM Tris pH 8.0。在一些实施方案中,本文所公开的制剂包含约0.5mM至约1.5mM氯化镁。在一些实施方案中,本文所公开的制剂包含约100mM至约300mM氯化钠。在一些实施方案中,本文所公开的制剂包含约0.001%至约0.005%泊洛沙姆188。在一些实施方案中,本文所公开的制剂包含约 $1E+13$ vg/mL至约 $5E+13$ vg/mL。

[0081] 在一些实施方案中,本文所公开的治疗性组合物具有 ≤ 1 CFU/10mL的总好氧微生物计数(TAMC)和 ≤ 1 CFU/10mL的总合并酵母和霉菌计数(TYMC)。可以通过膜过滤USP<61>方法测量TAMC和TYMC的量。

[0082] 在一些实施方案中,本文所公开的组合物包含小于约0.5EU/mL、小于约0.4EU/mL、小于约0.3EU/mL、小于约0.2EU/mL或小于约0.1EU/mL的内毒素水平。可以通过动力学显色法测量内毒素水平。

[0083] 在一些实施方案中,本文所公开的组合物对支原体和螺原体的存在呈阴性。可以通过支原体与支原体抑菌测试(USP<63>)来确定支原体和螺原体的存在。

[0084] 在一些实施方案中,在本文所公开的组合物中未检测到外来作用物。可以通过直接接种至以下三种细胞系中在体外确定病毒污染物的存在:MRC-5、Vero和HeLa细胞。可以通过接种于成年小鼠、豚鼠、乳鼠和含胚鸡蛋中在体内确定病毒污染物的存在。

[0085] 在一些实施方案中,在本文所公开的组合物中未检测到有复制能力的AAV。可以通过连续感染和qPCR确定有复制能力的AAV的存在。

[0086] 在一些实施方案中,本文所公开的组合物具有 $>$ 约90%的纯度并且没有 $>$ 约2%的单一杂质。在一些实施方案中,本文所公开的组合物具有大于约90%、约95%或约99%的纯度。在一些实施方案中,本文所公开的组合物不包含大于约5%v/v、约4%v/v、约3%v/v或约2%v/v的任何单一杂质。可以通过SDS-PAGE SYPRO[®]Ruby确定纯度。

[0087] 在一些实施方案中,通过HPLC-RI或通过紫外光吸收来确定本文所公开的组合物中残留Triton X-100的存在。

[0088] 在一些实施方案中,本文所公开的组合物包含小于 $1.7\text{ng}/1\times 10^{13}\text{vg}$ 、小于 $1.67\text{ng}/1\times 10^{13}\text{vg}$ 、小于 $1.6\text{ng}/1\times 10^{13}\text{vg}$ 或小于 $1.5\text{ng}/1\times 10^{13}\text{vg}$ 的残留苯宗酶(benzonase)。可以通过ELISA测量残留苯宗酶的水平。

[0089] 在一些实施方案中,通过BacPAK[™]测定来确定本文所公开的组合物中残留杆状病毒的存在。

[0090] 在一些实施方案中,通过qPCR确定本文所公开的组合物中残留SF9宿主细胞DNA的

存在。

[0091] 在一些实施方案中,通过ELISA确定本文所公开的组合物中残留SF9宿主细胞蛋白的存在。

[0092] 在一些实施方案中,本文所公开的组合物对诺达病毒(nodavirus)呈阴性。可以通过qPCR确定诺达病毒的存在。

[0093] 在一些实施方案中,在本文所公开的组合物中未检测到分枝杆菌DNA。可以通过qPCR确定分枝杆菌DNA的存在。

[0094] 在一些实施方案中,通过膜过滤USP<71>测试本文所公开的组合物的无菌性。在一些实施方案中,本文所公开的组合物在此测试中未展现出生长。

[0095] 在一些实施方案中,通过USP<71>测试本文所公开的组合物的细菌抑制/真菌抑制。在一些实施方案中,本文所公开的组合物在此测试中未展现出生长的抑制。

[0096] 在一些实施方案中,通过AAV9特异性ELISA测试本文所公开的组合物中AAV9衣壳的存在。

[0097] 在一些实施方案中,通过针对病毒颗粒蛋白的免疫印迹来测试本文所公开的组合物中AAV衣壳蛋白的存在。

[0098] 在一些实施方案中,通过下一代测序来测试本文所公开的组合物的DNA同一性。

[0099] 在一些实施方案中,本文所公开的组合物具有约300mOsm/kg至约500mOsm/kg的渗透压。在一些实施方案中,本文所公开的组合物具有约388mOsm/kg至约426mOsm/kg的渗透压。可以通过冰点降低法测量渗透压。

[0100] 在一些实施方案中,本文所公开的组合物具有约7至约9的pH。在一些实施方案中,本文所公开的组合物具有8.0+/-0.5的pH。可以通过pH计测量pH。

[0101] 在一些实施方案中,本文所公开的组合物是透明至略微不透明的,是无色至微白色溶液,并且通过目视检查确定不含可见颗粒。

[0102] 在一些实施方案中,本文所公开的组合物包含约6000个 $\geq 10\mu\text{m}$ 的颗粒/容器和 \leq 约600个 $\geq 25\mu\text{m}$ 的颗粒/容器。可以通过USP<787>方法测量亚可见微粒物。

[0103] 在一些实施方案中,通过动态光散射(DLS)测试本文所公开的组合物的聚集体。

[0104] 在一些实施方案中,本文所公开的组合物包含约300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至约1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的总蛋白水平。可以通过Micro BCA™蛋白测定试剂盒来测量总蛋白水平。

[0105] 在一些实施方案中,本文所公开的治疗性组合物在容器中。在一些实施方案中,通过染料进入测试来测试容器封闭。在一些实施方案中,容器中组合物的可提取体积为至少约1.0mL。

[0106] 在一些实施方案中,本文所公开的组合物包含约0.0007%至约0.0012%的普朗尼克。

[0107] 在一些实施方案中,本文所公开的组合物包含小于约 5.5×10^4 个拷贝RNA/mL的弹状病毒。

[0108] 在一些实施方案中,本文所公开的治疗性组合物具有以下一项或多项:TAMC \leq 1CFU/10mL;TYMC \leq 1CFU/10mL;包含 \leq 5EU/mL的内毒素水平;对支原体和螺原体的存在呈阴性;没有证据显示受到外来病毒作用物污染;具有 $\geq 3.0 \times 10^{13}$ vg/mL的物理滴度;不展现出可检测的有复制能力的AAV;具有>90%的纯度并且没有>2%的单一杂质;具有<1.67ng/

1×10^{13} vg的残留苯宗酶;具有 $\leq 15\%$ 的空衣壳;具有 $< 42 \text{ ng} / 1 \times 10^{13} \text{ vg}$ 的残留Sf9宿主细胞蛋白;对诺达病毒呈阴性;并且未检测到分枝杆菌DNA。

[0109] 在一些实施方案中,本文所公开的治疗性组合物具有以下一项或多项:在无菌试验中未展现出生长;包含 $\leq 5 \text{ EU} / \text{mL}$ 的内毒素水平;对AAV9衣壳蛋白呈阳性;包含预期的DNA序列;包含 $\geq 3.0 \times 10^{13} \text{ vg} / \text{mL}$;具有 $> 90\%$ 的纯度并且没有 $> 2\%$ 的单一杂质;具有约 $388 \text{ mOsm} / \text{kg}$ 至约 $426 \text{ mOsm} / \text{kg}$ 的渗透压;具有 8.0 ± 0.5 的pH;是透明至略微不透明的;是无色至微白色溶液;通过目视检查确定不含可见颗粒;包含6000个 $\geq 10 \mu\text{m}$ 的颗粒/容器和 ≤ 600 个 $\geq 25 \mu\text{m}$ 的颗粒/容器;并且在容器中包含 $\geq 1.0 \text{ mL}$ 的可提取体积。

[0110] 在一些实施方案中,本文所公开的含有rAAV的组合物和制剂可以用于治疗与异常溶酶体功能相关的疾病。在一些实施方案中,本文所公开的含有rAAV的组合物和制剂可以用于治疗神经退行性病症或疾病。在一些实施方案中,可以向受试者施用本文所公开的包含含有编码人类GCCase蛋白的rAAV载体的rAAV的组合物或制剂以治疗戈谢病(Gaucher disease)或帕金森氏病(Parkinson's disease)(例如,具有GBA1突变的帕金森氏病)。在一些实施方案中,可以向受试者施用本文所公开的包含含有编码人类颗粒蛋白前体蛋白的rAAV载体的rAAV的组合物或制剂以治疗具有GRN突变(FTD-GRN)的额颞叶痴呆。在一些实施方案中,可以向受试者施用本文所公开的包含含有编码人类葡糖脑苷脂酶蛋白的rAAV载体和编码靶向人类 α -突触核蛋白的抑制性RNA的多核苷酸的rAAV的组合物或制剂以治疗突触核蛋白病或帕金森症。在一些实施方案中,可以向受试者施用本文所公开的包含含有rAAV载体的rAAV的组合物或制剂以治疗突触核蛋白病或帕金森症,所述rAAV载体包含编码靶向人类 α -突触核蛋白的抑制性RNA的多核苷酸。

[0111] 重组杆状病毒

[0112] 本公开的方法包括用重组杆状病毒(rBV)群体共感染昆虫细胞以产生编码所关注的基因(也称作外源基因)的rAAV。至少两个rBV群体可以用于本公开的方法中。用于产生重组杆状病毒的方法是本领域中已知的(参见例如Bac-to-Bac[®]杆状病毒表达系统(Invitrogen, Carlsbad, CA))。

[0113] 在一些方面,rBV基因组来源于苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*)多衣壳核型多角体病毒(AcMNPV)、家蚕(*Bombyx mori*)核型多角体病毒(BmNPV)、棉铃虫(*Helicoverpa armigera*) (HearNPV)或甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)MNPV。在一些实施方案中,rBV基因组来源于AcMNPV克隆体C6。

[0114] 第一rBV载体群体可以包含rBV基因组,所述基因组包含表达盒,所述表达盒包含所关注的外源基因(GOI)和相关调控序列。这种rBV可以称作“rBV GOI”。在一些实施方案中,rBV基因组包含表达盒,所述表达盒包含:(1)编码外源蛋白的多核苷酸,(2)编码抑制性RNA的多核苷酸,或(3)编码外源蛋白的多核苷酸和编码抑制性RNA的多核苷酸。表达盒由两个AAV ITR侧接。在一些实施方案中,至少一个ITR是AAV2 ITR(例如,野生型AAV2 ITR(SEQ ID NO:5))。在一些实施方案中,至少一个ITR来源于野生型AAV2 ITR。在一些实施方案中,GOI是编码人类GCCase、人类PGRN、人类PSAP、人类C9orf72、人类TREM2、人类ApoE2或人类帕金森蛋白的基因。在一些实施方案中,抑制性RNA靶向人类 α -突触核蛋白、人类ATXN2、人类MAPT或人类ApoE。在一些实施方案中,rBV基因组包含编码人类GCCase的多核苷酸(例如,SEQ ID NO:2)和编码靶向人类 α -突触核蛋白的抑制性RNA的多核苷酸(例如,SEQ ID NO:12)。在

一些实施方案中, rBV基因组包含编码人类C9orf72(即, 功能性C9orf72)的多核苷酸和编码靶向人类C9orf72的抑制性RNA的多核苷酸。在一些实施方案中, rBV基因组包含编码人类ApoE2(即, 功能性ApoE2)的多核苷酸和编码靶向人类ApoE的抑制性RNA的多核苷酸。包括于rBV基因组中的适合的多核苷酸序列的实例在W02019/070891、W02019/070893、W02019/070894和W02019/084068中公开, 每篇文献的公开内容以全文引用的方式并入本文中。

[0115] 在一些方面, 本文所公开的方法中使用的rBV基因组包含编码GCCase的人类GBA1基因。在一些实施方案中, 已经对编码GCCase的核苷酸序列进行密码子优化(例如, 针对在哺乳动物细胞, 例如人类细胞中的表达进行密码子优化)。在一些实施方案中, 编码GCCase的核苷酸序列编码包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列(例如, NCBI参考序列NP_000148.2)的蛋白质。在一些实施方案中, 编码GCCase的核苷酸序列包含SEQ ID NO:2的序列。在一些方面, 本文所公开的方法中使用的rBV基因组包含人类GBA1基因并且还包含牛生长激素polyA信号尾(bGH)、WPRE、鸡β肌动蛋白启动子(CBAp)、巨细胞病毒增强子(CMVe)、人工内含子或人工外显子, 或此类序列的任何组合。

[0116] 在一些方面, 本文所公开的方法中使用的rBV基因组包含编码PGRN的人类PGRN基因(也称为GRN基因)。在一些实施方案中, 已经对编码PGRN的核苷酸序列进行密码子优化(例如, 针对在哺乳动物细胞, 例如人类细胞中的表达进行密码子优化)。在一些实施方案中, 编码PGRN的核苷酸序列编码包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列(例如, NCBI参考序列NP_002078.1)的蛋白质。在一些实施方案中, 编码PGRN的核苷酸序列包含SEQ ID NO:4的序列。

[0117] 本文还提供了一种包含基因组的重组杆状病毒, 所述基因组包含所关注的外源基因, 其中所关注的外源基因编码人类葡糖脑苷脂酶蛋白; 并且其中所述人类葡糖脑苷脂酶蛋白由SEQ ID NO:2的核苷酸序列编码。本文还提供了一种包含基因组的重组杆状病毒, 所述基因组包含所关注的外源基因, 其中所关注的外源基因编码人类颗粒蛋白前体蛋白; 并且其中所述人类颗粒蛋白前体蛋白由SEQ ID NO:4的核苷酸序列编码。本文还提供了一种受本文所公开的重组杆状病毒感染的昆虫细胞。

[0118] 一个或多个额外rBV载体群体可以各自包含编码AAV Rep蛋白和/或AAV Cap蛋白的表达盒。AAV Rep表达盒表达AAV复制酶。AAV Cap表达盒表达AAV病毒结构蛋白(VP1、VP2、VP3), 也称作衣壳蛋白。在一些实施方案中, AAV Cap表达盒表达AAV9结构蛋白。在一些实施方案中, AAV Cap表达盒表达AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV10或AAV11结构蛋白, 或这些结构蛋白中任一者的变体。

[0119] 用于产生包含重组腺相关病毒的组合物的方法

[0120] 在一些方面, 本文所公开的用于产生包含rAAV的组合物的方法包括上游过程和下游过程。在一些实施方案中, 上游过程包括昆虫细胞扩增、rBV种子储备产生、昆虫细胞与两种rBV的共感染、受感染的细胞溶解、溶解产物的澄清和切向流过滤(TFF1)浓缩和透滤。在一些实施方案中, 下游过程包括AAV亲和纯化、色谱、切向流过滤(TFF2)和无菌过滤。

[0121] 本文提供了一种用于产生细胞溶解产物的方法, 所述方法包括: (i) 获得含有悬浮于包含两种或更多种无血清和/或无蛋白质昆虫细胞培养基的混合物中的昆虫细胞的生物反应器; (ii) 用第一杆状病毒载体群体以介于约1.0与2.0之间的感染复数(MOI)感染昆虫细胞, 其中所述第一杆状病毒载体群体包含编码所关注的基因产物的表达盒; (iii) 用一个或多个额外杆状病毒载体群体以介于约1.0与2.0之间的MOI感染昆虫细胞, 其中所述额外

群体各自包含编码AAV Rep蛋白和/或AAV Cap蛋白的表达盒；(iv) 在受感染的昆虫细胞产生编码所关注的基因的rAAV颗粒的条件下培养受感染的昆虫细胞；以及(v) 使受感染的昆虫细胞溶解以产生包含rAAV颗粒的细胞溶解产物。

[0122] 在一些实施方案中，两种或更多种无血清和/或无蛋白质昆虫培养基选自4Ce11 Insect CD培养基、ESF-921、ESF-AF、ExpiSf CD培养基、Express Five SFM、baculoGROW、IS SF和SF900 II SFM。在一些实施方案中，混合物包含介于约10%v/v与50%v/v之间的SF900 II SFM培养基。

[0123] 在一些实施方案中，在原株扩种4-6代后获得昆虫细胞。在一些实施方案中，步骤(ii)的感染和步骤(iii)的感染同时发生。

[0124] 在一些实施方案中，昆虫细胞以介于 $8E+06$ 个活细胞/毫升(vc/mL)至约 $20E+06$ vc/mL之间的细胞密度存在于生物反应器中。

[0125] 在一些实施方案中，步骤(iv)的培养在1天与5天之间持续发生。

[0126] 在一些实施方案中，步骤(v)的溶解包括使受感染的昆虫细胞与去垢剂接触。

[0127] 在一些实施方案中，用于产生细胞溶解产物的方法还包括通过深度过滤使细胞溶解产物澄清的步骤。

[0128] 在一些实施方案中，用于产生细胞溶解产物的方法还包括通过切向流过滤和/或透滤来浓缩溶解产物中的rAAV颗粒的步骤。

[0129] 在一些实施方案中，细胞溶解产物包含(a) 约 $1E+11$ 个病毒基因组/毫升(vg/mL)至约 $1.0E+13$ vg/mL；(b) 约 $2E+11$ vg/mL至约 $1.0E+13$ vg/mL；或(c) 约 $5E+11$ vg/mL至约 $1.0E+13$ vg/mL。

[0130] 本文还提供了一种用于产生治疗性组合物的方法，所述方法包括：(i) 获得包含rAAV颗粒的细胞溶解产物；(ii) 使亲和色谱柱与细胞溶解产物接触，其中所述亲和柱包含在rAAV颗粒结合至亲和色谱柱的条件下对rAAV颗粒的衣壳蛋白具有特异性的结合剂；(iii) 从柱上洗脱结合的rAAV颗粒，从而产生第一洗脱液；(iv) 对第一洗脱液进行阴离子交换色谱以产生第二洗脱液，其中所述第二洗脱液包含比第一洗脱液更少的空rAAV颗粒；(v) 通过使用包含Tris、 $MgCl_2$ 、NaCl和泊洛沙姆188的流动缓冲液进行切向流过滤来浓缩第二洗脱液，从而产生包含rAAV颗粒的治疗性组合物。

[0131] 在一些实施方案中，结合剂包含对AAV9衣壳蛋白具有特异性的亲和树脂。

[0132] 在一些实施方案中，阴离子交换色谱包括将第一洗脱液与平衡缓冲液混合以产生具有介于约 $0.5mS/cm$ 至 $5mS/cm$ 之间的电导率的混合物，任选地其中所述混合物具有 $2mS/cm$ 的电导率，使混合物结合至含季胺的树脂以使混合物中的rAAV颗粒结合至树脂，以及从树脂上洗脱rAAV颗粒以产生第二洗脱液。

[0133] 在一些实施方案中，将第二洗脱液从约 $1.0E+12$ vg/mL浓缩至约 $1E+14$ vg/mL。在一些实施方案中，将第二洗脱液从约 $1.0E+13$ vg/mL浓缩至约 $5E+13$ vg/mL。

[0134] 在一些实施方案中，通过实施例2(见下文)中所描述的方法产生包含重组腺相关病毒的组合物。

[0135] 在一些实施方案中，通过本文所公开的方法产生的组合物(例如，原料药物质)包含至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的全rAAV颗粒。在一些方面，通过本文所公开的方法产生的组合物包含小于约15%、小于约10%或小于约5%的空rAAV颗粒。用

于测定空AAV颗粒和全AAV颗粒的方法是本领域中已知的。参见例如Grimm等(1999) Gene Therapy 6:1322-1330;Sommer等(2003) Mol. Ther. 7:122-128。

[0136] 在本文所公开的方法的一些实施方案中,AAV Cap表达盒表达AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10或AAV11结构蛋白,或此类结构蛋白的变体。AAV9在U.S.7,198,951和Gao等(2004) J. Virol. 78:6381-6388中描述,每篇文献特此以全文引用的方式并入。

[0137] 在本文所公开的方法的一些实施方案中,所关注的外源基因是人类GBA1或人类PGRN。在本文所公开的方法的一些实施方案中,所关注的外源基因编码人类葡糖脑苷脂酶蛋白或人类颗粒蛋白前体蛋白。在本文所公开的方法的一些实施方案中,人类葡糖脑苷脂酶蛋白由SEQ ID NO:2的核苷酸序列编码。在本文所公开的方法的一些实施方案中,人类颗粒蛋白前体蛋白由SEQ ID NO:4的核苷酸序列编码。在本文所公开的方法的一些实施方案中,所关注的外源基因编码SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0138] 在本文所公开的方法的一些实施方案中,所关注的外源基因是人类PSAP、人类C9orf72、人类TREM2、人类ApoE2或人类帕金森蛋白。在本文所公开的方法的一些实施方案中,所关注的外源基因是编码抑制性RNA的多核苷酸。在一些实施方案中,抑制性RNA靶向人类 α -突触核蛋白、人类ATXN2、人类MAPT或人类ApoE。用于本文所公开的方法中的适合的多核苷酸序列的实例在W02019/070891、W02019/070893、W02019/070894和W02019/084068中公开,每篇文献的公开内容以全文引用的方式并入本文中。

[0139] 本文还提供了一种通过本文所公开的方法中的任一者产生的组合物。

[0140] 用于包含重组腺相关病毒的组合物的过程和释放测试

[0141] 可以测试通过本文所描述的方法产生的rAAV组合物以及在所述方法的中间步骤中产生的材料的以下一项或多项:安全性、同一性、滴度、纯度、杂质、物理化学特性、生物特性和可提取体积(容器中的体积)。

[0142] 评估安全性的测试可以包括:无菌性(美国药典(USP) <71>)、细菌抑制/真菌抑制(USP <71>)、内毒素、支原体(USP <63>)、体外来病毒、用于病毒污染物的体内测定、rcAAV和容器封闭。

[0143] 评估同一性的测试可以包括:用于特定AAV血清型衣壳蛋白的ELISA、用于rAAV分析的免疫印迹测定和用于所关注的外源基因(转基因)序列的DNA分离。

[0144] 评估滴度的测试可以包括:物理滴度(qPCR)、感染滴度、TCID₅₀和物理滴度:感染滴度比。

[0145] 评估纯度和杂质的测试可以包括:用于rAAV分析的SDS PAGE/银染测定、Triton X-100、通过ELISA分析的苯酚酶、通过qPCR分析的杆状病毒污染、TEM(全/空比)、Sf9宿主细胞DNA、Sf9宿主细胞蛋白(ELISA)和弹状病毒检测。

[0146] 评估物理化学特性和生物特性的测试可以包括:生物活性转基因表达(效力)、cGMP样品的渗透压、质量控制样品的pH、外观、亚可见颗粒物(USP <787>)、动态光散射和总蛋白(微小BCA)。

[0147] 本文提供了一种通过使用qPCR测量编码GCase的rAAV(例如,AAV9)滴度的测定(参见实施例11)。在测定期间去除污染材料(例如,非封装的DNA)。在初始步骤中,DNase用于去除非封装的DNA。然后,在进行qPCR之前添加蛋白酶以释放AAV衣壳。所述测定使用AAV9-

GBA1特异性引物和探针(正向引物,GAC TGT GGG ATC CGT TCG AA (SEQ ID NO:6);反向引物,GAT TGA CAC CCG GCT CAG A (SEQ ID NO:7);TaqMan探针,6FAM-CCA TGG AAT TCA GCA GCC CCA GC (SEQ ID NO:8) -TAMRA)以扩增载体中所关注的区域,然后使用qPCR进行定量。

[0148] 本文还提供了一种测量编码GCCase的rAAV(例如,AAV9)的体外效力的测定(参见实施例12)。以96孔格式进行所述测定。将HEK293细胞以20,000个细胞/孔铺板,并且第二天用不同浓度的AAV9-GBA1转导用于测试物品和参考标准。在一些实施方案中,参考标准是编码GCCase的纯化的rAAV,其效力先前已确定。转导后72小时使细胞溶解。使用荧光底物试卤灵- β -D-吡喃葡萄糖苷评估这些溶解产物中的GCCase活性。在GCCase存在下,催化这种底物以形成荧光产物试卤灵。随着反应的进行,直接监测试卤灵产生,以计算产物形成的速率。在过量试卤灵- β -D-吡喃葡萄糖苷底物(5.3mM)存在下并在测定的条件下,产物形成速率与GCCase蛋白的量成线性比例。对于每个GCCase活性测定,纯化的重组GCCase(rGBA,0至333ng/ml,R&D目录号7410-GHB-020,>95%纯度)的标准曲线与测试样品平行操作。设置这种曲线的线性回归的测定接受准则 $R^2 \geq 0.96$,以确保测量的酶促速率与GCCase蛋白水平相关。使用平行线分析计算相对于参考标准的相对效力的报告值。

[0149] 本文还提供了一种通过使用qPCR或ddPCR测量编码PGRN的rAAV(例如,AAV9)滴度的测定(参见实施例13)。在测定期间去除污染材料(例如,非封装的DNA)。在初始步骤中,DNase用于去除非封装的DNA。然后,在进行qPCR或ddPCR之前添加蛋白酶以释放AAV衣壳。所述测定使用AAV9-GRN特异性引物和探针(正向引物,5'-GTCTTCCACGACTGTGGGAT-3'(SEQ ID NO:9);反向引物,5'-GTCAGGGCCACCCAGCTC-3'(SEQ ID NO:10);TaqMan探针,5'-FAM-CCGTTGAGCCACCATGTGGACCC (SEQ ID NO:11) -TAMRA-3')以扩增载体中所关注的区域,然后使用qPCR或ddPCR进行定量。

[0150] 本文还提供了一种测量编码PGRN的rAAV(例如,AAV9)的体外效力的测定。以96孔格式进行所述测定。将HEK293细胞以20,000个细胞/孔铺板,并且第二天用不同药物浓度的AAV9-GRN转导用于测试物品和参考标准。转导后72小时,通过ELISA(AdipoGen Life Sciences目录号AG-45A-0018YEK-KI01)测量PGRN水平。使用平行线分析计算相对于参考标准的相对效力的报告值。

[0151] 所有出版物、专利和专利申请都以全文引用的方式并入本文中,程度如同每个单独的出版物、专利或专利申请具体地并单独地指示以全文引用的方式并入一样。

[0152] 提出以下实施例以便为本领域普通技术人员提供如何制备和评价本文所描述和要求保护的化合物、组合物、物品、装置和/或方法的全面公开和描述,并且旨在作为纯粹的示例且不在限制发明者认为是其发明的范围。

[0153] 实施例

[0154] 实施例1

[0155] 将昆虫细胞解冻并且以大于 $3.0E+05$ 个活细胞/ml(第1代,P1)接种于第一无血清和/或无蛋白质昆虫细胞培养基(例如,4Cell Insect CD培养基、ESF-921、ESF AF、ExpiSf CD培养基、Express Five SFM、baculoGROW、IS SF和SF900 II SFM)中以建立种子培养物。将种子培养物中的细胞培养4-6代,然后接种至rAAV产生的主要生物反应中。

[0156] 在主要生物反应期间,通过将2L种子培养物与第一昆虫细胞培养基以约 $4.0E+05$ 至 $6.0E+05$ 个细胞/ml的密度混合至10L总体积,将上述种子培养物移至N-2培养容器中。在

N-2培养容器中培养细胞96小时,达到大于 $5.5E+06$ vc/mL的培养密度和大于90%的活细胞。随后,将10L含细胞的N-2培养物移至N-1培养容器中,并且以约 $5.0E+05$ 至 $1.5E+06$ vc/mL的起始细胞密度与第一昆虫细胞培养基混合。N-1培养物还含有0.1%-0.3% (v/v)的泊洛沙姆188溶液。通过添加更多的第一昆虫培养基,使N-1培养容器中的总体积达到50L。可以根据需要将消泡剂添加至培养物中。培养细胞72小时以达到大于 $5.5E+06$ vc/ml的最终密度和大于90%的活细胞。

[0157] 在准备rBV感染时,将N-1培养物与第二无血清和/或无蛋白质昆虫细胞培养基(例如,4Cell Insect CD培养基、ESF-921、ESF AF、ExpiSf CD培养基、Express Five SFM、baculoGROW、IS SF和SF900 II SFM)混合,并且补充有消泡剂和0.1%-0.3% (v/v)泊洛沙姆188溶液。将第一昆虫细胞培养基添加至混合物中以达到所需的总体积。在此阶段混合物中第一昆虫细胞培养基的比率介于约30%与70%之间。起始细胞密度介于约 $1.00E+06$ 与 $2.00E+06$ vc/mL之间。培养细胞96小时以达到介于 $1.00E+07$ 至 $2.00E+07$ vc/mL之间的细胞密度。然后用编码Rep/AAV9 Cap的rBV和编码靶基因(例如,GBA、PGRN、PSAP、TREM2或APOE)的rBV感染细胞,对于每个rBV,感染复数介于约1个感染单位(IFU)/细胞至2IFU/细胞之间。添加至培养物中的rBV中每一者的体积介于约5与26L之间,这取决于病毒滴度。一旦将rBV添加至培养物中,就使用第二昆虫细胞培养基调整培养物的总体积,使得混合物中第一昆虫细胞培养基的百分比介于10%与50% (v/v)之间。在感染后15与25小时之间,向培养物补充介于约3%与8% (v/v)之间的产生促进添加剂(PBA)。在感染后约72至120小时收获细胞。

[0158] 为了收获,在含有介于约0.2%与0.8% (w/v)之间的Triton的Tris缓冲液中使昆虫细胞溶解。在溶解缓冲液中孵育细胞约30分钟至约90分钟。在约1.5至2.5mM $MgCl_2$ 存在下,用浓度为约42IU/mL至60IU/mL的苯宗酶处理细胞溶解产物约45分钟至75分钟。用约100mM至300mM的NaCl淬灭反应。细胞溶解产物含有被感染的昆虫细胞包装的rAAV。

[0159] 然后对所得细胞溶解产物进行澄清步骤。使用Millistak+[®]HC Pod深度过滤器、DOHC介质系列、 $1.1m^2$ 表面积(POD DOHC)通过深度过滤进行初步澄清,冲洗流速为约12-20L/min并且最大压力为8-14psi。使用Millistak+[®]HC Pod深度过滤器、A1HC介质系列、 $0.11m^2$ 表面积(POD A1HC)通过深度过滤进一步澄清细胞溶解产物,冲洗流速为约8-15L/min并且压力为8-14psi。随后,使用第一昆虫培养基对溶解产物进行调节和追踪,在澄清步骤之前得到介于约75%与95%之间的细胞溶解产物。通过TFF浓缩细胞溶解产物。在TFF期间,细胞溶解产物经历水冲洗、透滤缓冲液(DF缓冲液)调节、DF缓冲液冲洗和DF缓冲液追踪。DF缓冲液含有20mM Tris、500mM NaCl和0.1%普朗尼克,并且具有介于约7.5与8.5之间的pH。以3-8的浓度因子进行DF缓冲液冲洗步骤。浓缩后的产率介于TFF前溶解产物的约60%与约80%之间。

[0160] 使用Opticap XL10过滤器通过透滤对浓缩的细胞溶解产物进行无菌过滤。过滤后的细胞溶解产物产率介于无菌过滤前细胞溶解产物的80%与98%之间。可以将细胞溶解产物冷冻并储存于-80°C下。在一些实施方案中,将细胞溶解产物解冻并测试生物负荷。

[0161] 在对rAAV进行色谱纯化之前,将细胞溶解产物解冻并使用Sartopore 2膜过滤。预先冲洗过滤器并用亲和纯化平衡缓冲液平衡。在14.00psi的最大压力和750mL/min的流速下进行过滤。过滤后,再次用亲和纯化平衡缓冲液冲洗过滤器。为了纯化rAAV,亲和纯化后进行阴离子交换纯化。

[0162] 衣壳特异性亲和纯化柱用于rAAV的亲亲和纯化。衣壳特异性亲和纯化树脂具有介于约 $2.00E+13$ 与 $9.00E+13$ vg/mL之间的负载能力。衣壳特异性亲和纯化树脂的总结合能力介于约 $1.00E+13$ 与约 $1.00E+14$ vg/mL之间。向柱中注入注射用水(WFI),并且用0.06-0.12M磷酸进行酸洗提。然后使用80-120mM Tris和1.8-2.2M NaCl再生所述柱。再生后,使用亲和和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡,所述缓冲液含有约0.8-1.5mM柠檬酸、12-22mM磷酸盐、300-400mM NaCl、0.2%-0.8%蔗糖、0.06%至0.2% F-68。平衡后将细胞溶解产物加载至柱中,并且加载后再次对柱进行平衡。通过使用洗涤缓冲液进行高盐洗涤,所述缓冲液含有约0.8-1.5mM柠檬酸、12-22mM磷酸盐、800-1500mM NaCl、0.2%-0.8%蔗糖、0.06%至0.2% F-68。高盐洗涤后,在洗脱前用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡。亲和纯化色谱洗脱缓冲液含有10-18mM柠檬酸、300-400mM NaCl、0.2%-0.8%蔗糖、0.06%至0.2%F-68,pH为2.2至2.8。洗脱的rAAV的收集开始于A280处约大于30mAU的洗脱峰。洗脱后,对柱进行酸洗提并再生。使用4-9M盐酸胍以介于约45与70cm/h之间的线性流速清洗柱。然后用注射用水和储存缓冲液洗涤柱,所述缓冲液含有1mM柠檬酸、18mM磷酸盐、20%乙醇,线性流速为45-70cm/h。除非另有指定,否则将上文所描述的缓冲液和样品以介于约120与180cm/h之间的线性流速加载至柱中。然后使用磷酸盐缓冲液中和洗脱级分,所述缓冲液含有0.25-0.6M磷酸盐,pH为8.2至9.5。中和后洗脱级分的目标pH为6.8-8。

[0163] 在准备阴离子交换色谱时,使用Kleenpak过滤器过滤来自亲和和色谱后的中和洗脱级分的样品,并且使用阴离子交换色谱平衡缓冲液稀释和平衡,所述缓冲液含有12-22mM Bis-Tris丙烷、0.001%至0.01%F-68,pH 9.0-9.5,并且电导率介于0.5与3mS/cm之间。柱的加载密度介于约 $1.0+E13$ 与 $4.0+E13$ vg/ml之间。在稀释洗脱级分之前,通过以下步骤准备阴离子交换色谱柱:(i)用注射用水洗涤,(ii)用含有0.8-1.5M NaOH和1.5-2.2M NaCl的缓冲液消毒,(iii)再次用注射用水洗涤,(iv)用阴离子交换色谱洗脱缓冲液冲洗,所述洗脱缓冲液含有16-24mM Bis-Tris丙烷、0.8-1.5M NaCl、0.001%至0.01% F-68,以及(v)用阴离子交换色谱平衡缓冲液平衡,所述平衡缓冲液含有12-22mM Bis-Tris丙烷、0.001%至0.01% F-68。一旦平衡阴离子交换色谱柱,就将样品加载至柱上,其中加载pH介于约9.0与9.5之间,并且加载电导率介于0.5与3mS/cm之间。加载后,再次用阴离子交换色谱平衡缓冲液洗涤柱。首先用阴离子交换色谱平衡缓冲液洗脱样品,然后用阴离子交换色谱洗脱缓冲液洗脱。含有rAAV的级分的收集开始于A280处约大于3mAU的洗脱峰,并且结束于约小于20mAU的洗脱峰。然后使用CIM QA中和缓冲液中和来自阴离子交换色谱的洗脱级分,所述缓冲液含有0.2-1M Tris/HCL,pH为约5.8至6.8。除非另有指定,否则将阴离子交换色谱期间的缓冲液和样品以介于1.2L/min与2.5L/min之间的体积流速加载至柱中。

[0164] 中和后,通过切向流过滤和超滤/透滤浓缩样品,其中加载密度为约 $1.0E+17$ 至 $2.0E+17$ vg/m²病毒颗粒。过滤中使用的缓冲液含有Tris、MgCl₂、NaCl和泊洛沙姆188。

[0165] 过滤的样品含有纯化的rAAV颗粒并且储存于-80℃下的BDS储存器中。BDS储备液含有约 $2.5E+13$ 至 $4.5E+13$ vg/mL的rAAV颗粒,并且可以稀释至大于 $1E+13$ vg/mL的DP浓度。包装前对样品进行无菌过滤。

[0166] 实施例2

[0167] 将昆虫细胞解冻并且以大于 $3.0E+05$ 个活细胞/ml(第1代,P1)接种于SF900 II SFM中以建立种子培养物。将种子培养物中的细胞培养5代,然后接种至rAAV产生的主要生

物反应中。

[0168] 在主要生物反应期间,通过将2L种子培养物与SF900 II SFM以约 $5.0E+05$ 个细胞/mL的密度混合至10L总体积,将上述种子培养物移至N-2培养容器中。在N-2培养容器中培养细胞96小时,达到大于 $5.5E+06$ vc/mL的培养密度和大于90%的活细胞。随后,将10L含细胞的N-2培养物移至N-1培养容器中,并且以约 $1.0E+06$ vc/mL的起始细胞密度与SF-900II SFM混合。N-1培养物还含有0.1% (v/v) 泊洛沙姆188溶液。通过添加更多的SF900 II SFM,使N-1培养容器中的总体积达到50L。可以根据需要将消泡剂添加至培养物中。培养细胞72小时以达到大于 $5.5E+06$ vc/mL的最终密度和大于90%的活细胞。

[0169] 在准备rBV感染时,将N-1培养物与ESF AF培养基混合,并且补充有消泡剂和0.1% (v/v) 泊洛沙姆188溶液。将SF900 II SFM培养基添加至混合物中以达到所需的总体积。在此阶段混合物中SF900 II SFM的比率为约60% (v/v)。起始细胞密度为约 $1.50E+06$ 。培养细胞96小时以达到 $1.50E+07$ 的细胞密度。然后用编码Rep/AAV9 Cap的rBV和编码靶基因(例如,GBA、PGRN、PSAP、TREM2或APOE)的rBV感染细胞,对于每个rBV,感染复数为约1.5个感染单位(IFU)/细胞。添加至培养物中的rBV中每一者的体积介于约5与26L之间,这取决于病毒滴度。一旦将rBV添加至培养物中,就使用ESF AF培养基调整培养物的总体积,使得混合物中SF900 II SFM的百分比为40% (v/v)。在感染后约20小时,向培养物补充约5% (v/v)的产生促进添加剂(PBA)。在感染后约72小时收获细胞。

[0170] 收获时,在含有0.5% (w/v) Triton的Tris缓冲液中使昆虫细胞溶解。将细胞在溶解缓冲液中孵育约60分钟。在约2mM $MgCl_2$ 存在下,用浓度为约50IU/mL的苯宗酶处理细胞溶解产物约60分钟。用约240mM NaCl淬灭反应。细胞溶解产物含有被感染的昆虫细胞包装的rAAV。

[0171] 然后对所得细胞溶解产物进行澄清步骤。使用Millistak+[®]HC Pod深度过滤器、D0HC介质系列、 $6x 1.1m^2$ 表面积(POD D0HC)通过深度过滤进行初步澄清,冲洗流速为约18L/min并且最大压力小于14psi。使用Millistak+[®]HC Pod深度过滤器、A1HC介质系列、 $3x 1.1m^2$ 表面积(POD A1HC)通过深度过滤进一步澄清细胞溶解产物,冲洗流速为约11L/min并且压力小于14psi。随后,使用SF900 II SFM对溶解产物进行调节和追踪,在澄清步骤之前得到约80%的细胞溶解产物。通过TFF浓缩细胞溶解产物。在TFF期间,细胞溶解产物经历水冲洗、透滤缓冲液(DF缓冲液)调节、DF缓冲液冲洗和DF缓冲液追踪。DF缓冲液含有20mM Tris、500mM NaCl和0.001%普朗尼克,并且具有8.0的pH。以6的浓缩因子进行DF缓冲液冲洗步骤。浓缩后的产率为TFF前溶解产物的约90%。

[0172] 使用Opticap XL10过滤器通过透滤对浓缩的细胞溶解产物进行无菌过滤。过滤后的细胞溶解产物产率为无菌过滤前细胞溶解产物的约95%。可以将细胞溶解产物冷冻并储存于-80℃下。

[0173] 在对rAAV进行色谱纯化之前,将细胞溶解产物解冻并使用Sartopore 2膜过滤。预先冲洗过滤器并用亲和纯化平衡缓冲液平衡。在14.00psi的最大压力和750mL/min的流速下进行过滤。过滤后,再次用亲和纯化平衡缓冲液冲洗过滤器。为了纯化rAAV,亲和纯化后进行阴离子交换纯化。

[0174] 衣壳特异性亲和纯化柱用于rAAV的亲和纯化。衣壳特异性亲和纯化树脂具有约 3.0 至 $9.0E+13$ vg/mL的负载能力。衣壳特异性亲和纯化树脂的总结合能力为约 $4.2E+17$ vg。

向柱中注入注射用水(WFI),并且用0.1M磷酸进行酸洗提。然后使用100mM Tris和2M NaCl再生所述柱。再生后,使用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡,所述缓冲液含有约1mM柠檬酸、18mM磷酸盐、350mM NaCl、0.5%蔗糖、0.1%F-68。平衡后将细胞溶解产物加载至柱中,并且加载后再次用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡。通过使用洗涤缓冲液进行高盐洗涤,所述缓冲液含有约1mM柠檬酸、18mM磷酸盐、1000mM NaCl、0.5%蔗糖、0.1% F-68。高盐洗涤后,在洗脱前用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡。亲和纯化色谱洗脱缓冲液含有14mM柠檬酸、350mM NaCl、0.5%蔗糖、0.1% F-68,pH为2.5。洗脱的rAAV的收集开始于A280处约大于50mAU的洗脱峰。洗脱后,对柱进行酸洗提并再生。使用6M盐酸胍以约60cm/h的线性流速清洗柱。然后用注射用水和储存缓冲液洗涤柱,所述缓冲液含有1mM柠檬酸、18mM磷酸盐、20%乙醇,线性流速为60cm/h。除非另有指定,否则将上文所描述的缓冲液和样品以约150cm/h的线性流速加载至柱中。然后使用磷酸盐缓冲液中和洗脱级分,所述缓冲液含有0.4M磷酸盐,pH为9。中和后洗脱级分的目标pH为6.8-8。

[0175] 在准备阴离子交换色谱时,使用Kleenpak过滤器过滤来自亲和色谱后的中和洗脱级分的样品,并且使用阴离子交换色谱平衡缓冲液稀释和平衡,所述缓冲液含有20mM Bis-Tris丙烷、0.001% F-68,pH 9.2,并且电导率小于2.1mS/cm。柱的加载密度介于约 1.0×10^{13} 与 4.0×10^{13} vg/mL之间。在稀释洗脱级分之前,通过以下步骤准备阴离子交换色谱柱:(i)用注射用水洗涤,(ii)用含有1M NaOH和2M NaCl的缓冲液消毒,(iii)再次用注射用水洗涤,(iv)用阴离子交换色谱洗脱缓冲液冲洗,所述洗脱缓冲液含有20mM Bis-Tris丙烷、1M NaCl、0.001% F-68,以及(v)用阴离子交换色谱平衡缓冲液平衡,所述平衡缓冲液含有20mM Bis-Tris丙烷、0.001% F-68。一旦平衡阴离子交换色谱柱,就将样品加载至柱上,其中CIMQ缓冲液具有约9.3的pH,并且加载电导率小于2mS/cm。加载后,再次用阴离子交换色谱平衡缓冲液洗涤柱。首先用阴离子交换色谱平衡缓冲液洗脱样品,然后用阴离子交换色谱洗脱缓冲液洗脱。含有rAAV的级分的收集开始于约15mAU的洗脱峰。然后使用CIM QA中和缓冲液中和来自阴离子交换色谱的洗脱级分,所述缓冲液含有0.5M Tris/HCL,pH为约6.5。除非另有指定,否则将阴离子交换色谱期间的缓冲液和样品以2L/min的体积流速加载至柱中。

[0176] 中和后,通过TFF和超滤/透滤浓缩样品,其中加载密度为约 1.3×10^{17} vg/m²病毒颗粒。过滤中使用的缓冲液含有Tris、MgCl₂、NaCl和泊洛沙姆188。

[0177] 过滤的样品含有纯化的rAAV颗粒并且储存于-80℃下的BDS储存器中。BDS储备液含有约 4.0×10^{13} vg/mL的rAAV颗粒,并且可以稀释至大于 3.0×10^{13} vg/mL的DP浓度。包装前对样品进行无菌过滤。

[0178] 实施例3

[0179] 将昆虫细胞解冻并且以大于 3.0×10^5 个活细胞/mL(第1代,P1)接种于4Cell1 Insect CD培养基中以建立种子培养物。将种子培养物中的细胞培养3代,然后接种至rAAV产生的主要生物反应中。

[0180] 在主要生物反应期间,通过将2L种子培养物与4Cell Insect CD培养基以约 3.0×10^5 个细胞/mL的密度混合至10L总体积,将上述种子培养物移至N-2培养容器中。在N-2培养容器中培养细胞96小时,达到大于 5.5×10^6 vc/mL的培养密度和大于85%的活细胞。随后,将10L含细胞的N-2培养物移至N-1培养容器中,并且以约 1.0×10^6 vc/mL的起始细胞密度与

4Cell Insect CD培养基混合。N-1培养物还含有9% (v/v) 泊洛沙姆188溶液。通过添加更多的4Cell Insect CD培养基,使N-1培养容器中的总体积达到50L。可以根据需要将消泡剂添加至培养物中。培养细胞72小时以达到大于 $5.5E+06$ vc/mL的最终密度和大于85%的活细胞。

[0181] 在准备rBV感染时,将N-1培养物与ExpiSf CD培养基混合,并且补充有消泡剂和9% (v/v) 泊洛沙姆188溶液。将4Cell Insect CD培养基添加至混合物中以达到所需的总体积。在此阶段混合物中4Cell Insect CD培养基的比率为约45% (v/v)。起始细胞密度为约 $1.20E+06$ 。培养细胞96小时以达到 $1.20E+07$ 的细胞密度。然后用编码Rep/AAV9Cap的rBV和编码靶基因(例如,GBA、PGRN、PSAP、TREM2或APOE)的rBV感染细胞,对于每个rBV,感染复数为约1个感染单位(IFU)/细胞。添加至培养物中的rBV中每一者的体积介于约5与26L之间,这取决于病毒滴度。一旦将rBV添加至培养物中,就使用ExpiSf CD培养基调整培养物的总体积,使得混合物中4Cell Insect CD培养基的百分比为40% (v/v)。在感染后约25小时,向培养物补充约5% (v/v)的产生促进添加剂(PBA)。在感染后约96小时收获细胞。

[0182] 收获时,在含有0.5% (w/v) Triton的Tris缓冲液中使昆虫细胞溶解。将细胞在溶解缓冲液中孵育约60分钟。在约 2.5mM MgCl_2 存在下,用浓度为约 30IU/mL 的苯宗酶处理细胞溶解产物约60分钟。用约 300mM NaCl淬灭反应。细胞溶解产物含有被感染的昆虫细胞包装的rAAV。

[0183] 然后对所得细胞溶解产物进行澄清步骤。使用Millistak+[®]HC Pod深度过滤器、D0HC介质系列、 1.1m^2 表面积(POD D0HC)通过深度过滤进行初步澄清,冲洗流速为约 12L/min 并且最大压力小于 12psi 。使用Millistak+[®]HC Pod深度过滤器、A1HC介质系列、 0.11m^2 表面积(POD A1HC)通过深度过滤进一步澄清细胞溶解产物,冲洗流速为约 9L/min 并且压力小于 12psi 。随后,使用4Cell Insect CD培养基对溶解产物进行调节和追踪,在澄清步骤之前得到约85%的细胞溶解产物。通过TFF浓缩细胞溶解产物。在TFF期间,细胞溶解产物经历水冲洗、透滤缓冲液(DF缓冲液)调节、DF缓冲液冲洗和DF缓冲液追踪。DF缓冲液含有 20mM Tris、 500mM NaCl和0.001%普朗尼克,并且具有8.5的pH。以5的浓缩因子进行DF缓冲液冲洗步骤。浓缩后的产率为TFF前溶解产物的约80%。

[0184] 使用Opticap XL10过滤器通过透滤对浓缩的细胞溶解产物进行无菌过滤。过滤后的细胞溶解产物产率为无菌过滤前细胞溶解产物的约90%。可以将细胞溶解产物冷冻并储存于 -80°C 下。

[0185] 在对rAAV进行色谱纯化之前,将细胞溶解产物解冻并使用Sartopore 2膜过滤。预先冲洗过滤器并用亲和纯化平衡缓冲液平衡。在 12.00psi 的最大压力和 780mL/min 的流速下进行过滤。过滤后,再次用亲和纯化平衡缓冲液冲洗过滤器。为了纯化rAAV,亲和纯化后进行阴离子交换纯化。

[0186] 衣壳特异性亲和纯化柱用于rAAV的亲和纯化。衣壳特异性亲和纯化树脂具有约 $3.0E+13\text{vg/mL}$ 的负载能力。衣壳特异性亲和纯化树脂的总结合能力为约 $1.20E+17$ 。向柱中注入注射用水(WFI),并且用 0.1M 磷酸进行酸洗提。然后使用 85mM Tris和 2M NaCl再生所述柱。再生后,使用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡,所述缓冲液含有约 1.2mM 柠檬酸、 15mM 磷酸盐、 300mM NaCl、0.2%蔗糖、0.08% F-68。平衡后将细胞溶解产物加载至柱中,并且加载后再次用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡。通过使用洗涤缓冲液进行高盐洗涤,所述

缓冲液含有约1.2mM柠檬酸、15mM磷酸盐、800mM NaCl、0.2%蔗糖、0.08%F-68。高盐洗涤后,在洗脱前用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡。亲和纯化色谱洗脱缓冲液含有10mM柠檬酸、300mM NaCl、0.2%蔗糖、0.08% F-68,pH为2.2。洗脱的rAAV的收集开始于A280处约大于30mAU的洗脱峰。洗脱后,对柱进行酸洗提并再生。使用4M盐酸胍以约60cm/h的线性流速清洗柱。然后用注射用水和储存缓冲液洗涤柱,所述缓冲液含有1.2mM柠檬酸、15mM磷酸盐、20%乙醇,线性流速为60cm/h。除非另有指定,否则将上文所描述的缓冲液和样品以约120cm/h的线性流速加载至柱中。然后使用磷酸盐缓冲液中和洗脱级分,所述缓冲液含有0.25M磷酸盐,pH为8.8。中和后洗脱级分的目标pH为7.5。

[0187] 在准备阴离子交换色谱时,使用Kleenpak过滤器过滤来自亲和和色谱后的中和洗脱级分的样品,并且使用阴离子交换色谱平衡缓冲液稀释和平衡,所述缓冲液含有12mM Bis-Tris丙烷、0.001% F-68,pH 9.0,并且电导率小于2.5mS/cm。柱的加载密度介于约 1.0×10^{13} 与 4.0×10^{13} vg/mL之间。在稀释洗脱级分之前,通过以下步骤准备阴离子交换色谱柱:(i)用注射用水洗涤,(ii)用含有0.8M NaOH和2M NaCl的缓冲液消毒,(iii)再次用注射用水洗涤,(iv)用阴离子交换色谱洗脱缓冲液冲洗,所述洗脱缓冲液含有16mM Bis-Tris丙烷、0.8M NaCl、0.0008%F-68,以及(v)用阴离子交换色谱平衡缓冲液平衡,所述平衡缓冲液含有20mM Bis-Tris丙烷、0.001% F-68。一旦平衡阴离子交换色谱柱,就将样品加载至柱上,其中加载pH为约9.0,并且加载电导率为2.3mS/cm。加载后,再次用阴离子交换色谱平衡缓冲液洗涤柱。首先用阴离子交换色谱平衡缓冲液洗脱样品,然后用阴离子交换色谱洗脱缓冲液洗脱。含有rAAV的级分的收集开始于A280处约大于6mAU的洗脱峰,并且结束于约小于20mAU的洗脱峰。然后使用CIM QA中和缓冲液中和来自阴离子交换色谱的洗脱级分,所述缓冲液含有0.4MTris/HCL,pH为约6.0。除非另有指定,否则将阴离子交换色谱期间的缓冲液和样品以1.5L/min的体积流速加载至柱中。

[0188] 中和后,通过切向流过滤和超滤/透滤浓缩样品,其中加载密度为约 1.42×10^{17} vg/ m^2 病毒颗粒。过滤中使用的缓冲液含有Tris、 $MgCl_2$ 、NaCl和泊洛沙姆188。

[0189] 过滤的样品含有纯化的rAAV颗粒并且储存于-80℃下的BDS储存器中。BDS储备液含有约 3.0×10^{13} vg/mL的rAAV颗粒,并且可以稀释至大于 1.0×10^{13} vg/mL的DP浓度。包装前对样品进行无菌过滤。

[0190] 实施例4

[0191] 将昆虫细胞解冻并且以大于 3.0×10^5 个活细胞/mL(第1代,P1)接种于ESF AF培养基中以建立种子培养物。将种子培养物中的细胞培养4代,然后接种至rAAV产生的主要生物反应中。

[0192] 在主要生物反应期间,通过将2L种子培养物与ESF AF培养基以约 4.0×10^5 个细胞/mL的密度混合至10L总体积,将上述种子培养物移至N-2培养容器中。在N-2培养容器中培养细胞96小时,达到大于 6.2×10^6 vc/mL的培养密度和大于93%的活细胞。随后,将10L含细胞的N-2培养物移至N-1培养容器中,并且以约 1.0×10^6 vc/mL的起始细胞密度与ESF AF培养基混合。N-1培养物还含有10%(v/v)泊洛沙姆188溶液。通过添加更多的ESF AF培养基,使N-1培养容器中的总体积达到50L。可以根据需要将消泡剂添加至培养物中。培养细胞72小时以大于 6×10^6 vc/mL的最终密度和大于90%的活细胞。

[0193] 在准备rBV感染时,将N-1培养物与ExpiSf CD培养基混合,并且补充有消泡剂和

10% (v/v) 泊洛沙姆188溶液。将ESF AF培养基添加至混合物中以达到所需的总体积。在此阶段混合物中ESF AF培养基的比率为约50% (v/v)。起始细胞密度为约 $1.80E+06$ 。培养细胞96小时以达到 $1.80E+07$ 的细胞密度。然后用编码Rep/AAV9 Cap的rBV和编码靶基因(例如, GBA、PGRN、PSAP、TREM2或APOE)的rBV感染细胞,对于每个rBV,感染复数为约1.8个感染单位(IFU)/细胞。添加至培养物中的rBV中每一者的体积介于约5与26L之间,这取决于病毒滴度。一旦将rBV添加至培养物中,就使用ExpiSf CD培养基调整培养物的总体积,使得混合物中ESF AF培养基的百分比为40% (v/v)。在感染后约25小时,向培养物补充约7% (v/v)的产生促进添加剂(PBA)。在感染后约84小时收获细胞。

[0194] 收获时,在含有0.5% (w/v) Triton的Tris缓冲液中使昆虫细胞溶解。将细胞在溶解缓冲液中孵育约45分钟。在约2.2mM $MgCl_2$ 存在下,用浓度为约30IU/mL的苯酚酶处理细胞溶解产物约60分钟。用约300mM NaCl淬灭反应。细胞溶解产物含有被感染的昆虫细胞包装的rAAV。

[0195] 然后对所得细胞溶解产物进行澄清步骤。使用Millistak+[®] HC Pod深度过滤器、DOHC介质系列、 $1.1m^2$ 表面积(POD DOHC)通过深度过滤进行初步澄清,冲洗流速为约14L/min并且最大压力为约10psi。使用Millistak+[®] HC Pod深度过滤器、A1HC介质系列、 $0.11m^2$ 表面积(POD A1HC)通过深度过滤进一步澄清细胞溶解产物,冲洗流速为约10L/min并且压力为约10psi。随后,使用ESF AF培养基对溶解产物进行调节和追踪,在澄清步骤之前得到约85%的细胞溶解产物。通过TFF浓缩细胞溶解产物。在TFF期间,细胞溶解产物经历水冲洗、透滤缓冲液(DF缓冲液)调节、DF缓冲液冲洗和DF缓冲液追踪。DF缓冲液含有20mM Tris、500mM NaCl和0.001%普朗尼克,并且具有8.0的pH。以5的浓缩因子进行DF缓冲液冲洗步骤。浓缩后的产率为TFF前溶解产物的约80%。

[0196] 使用Opticap XL10过滤器通过透滤对浓缩的细胞溶解产物进行无菌过滤。过滤后的细胞溶解产物产率为无菌过滤前细胞溶解产物的约95%。可以将细胞溶解产物冷冻并储存于-80℃下。

[0197] 在对rAAV进行色谱纯化之前,将细胞溶解产物解冻并使用Sartopore 2膜过滤。预先冲洗过滤器并用亲和纯化平衡缓冲液平衡。在约10.00psi和780mL/min的流速下进行过滤。过滤后,再次用亲和纯化平衡缓冲液冲洗过滤器。为了纯化rAAV,亲和纯化后进行阴离子交换纯化。

[0198] 衣壳特异性亲和纯化柱用于rAAV的亲和纯化。衣壳特异性亲和纯化树脂具有约 $3.2E+13$ vg/mL的负载能力。衣壳特异性亲和纯化树脂的总结合能力为约 $1.50E+17$ 。向柱中注入注射用水(WFI),并且用0.08M磷酸进行酸洗提。然后使用85mM Tris和1.8M NaCl再生所述柱。再生后,使用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡,所述缓冲液含有约1.2mM柠檬酸、18mM磷酸盐、380mM NaCl、0.5%蔗糖、0.08% F-68。平衡后将细胞溶解产物加载至柱中,并且加载后再次用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡。通过使用洗涤缓冲液进行高盐洗涤,所述缓冲液含有约1.2mM柠檬酸、18mM磷酸盐、800mM NaCl、0.5%蔗糖、0.08% F-68。高盐洗涤后,在洗脱前用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡。亲和纯化色谱洗脱缓冲液含有15mM柠檬酸、380mM NaCl、0.5%蔗糖、0.08% F-68,pH为2.5。洗脱的rAAV的收集开始于A280处约大于60mAU的洗脱峰。洗脱后,对柱进行酸洗提并再生。使用6M盐酸胍以约45cm/h的线性流速清洗柱。然后用注射用水和储存缓冲液洗涤柱,所述缓冲液含有1.2mM柠檬酸、

18mM磷酸盐、20%乙醇,线性流速为60cm/h。除非另有指定,否则将上文所描述的缓冲液和样品以约150cm/h的线性流速加载至柱中。然后使用磷酸盐缓冲液中和洗脱级分,所述缓冲液含有0.4M磷酸盐,pH为8.8。中和后洗脱级分的目标pH为7.2。

[0199] 在准备阴离子交换色谱时,使用Kleenpak过滤器过滤来自亲和色谱后的中和洗脱级分的样品,并且使用阴离子交换色谱平衡缓冲液稀释和平衡,所述缓冲液含有18mM Bis-Tris丙烷、0.001% F-68,pH 9.0,并且电导率小于1.8mS/cm。柱的加载密度介于约 1.0×10^{13} 与 4.0×10^{13} vg/mL之间。在稀释洗脱级分之前,通过以下步骤准备阴离子交换色谱柱:(i)用注射用水洗涤,(ii)用含有0.8M NaOH和2M NaCl的缓冲液消毒,(iii)再次用注射用水洗涤,(iv)用阴离子交换色谱洗脱缓冲液冲洗,所述洗脱缓冲液含有18mM Bis-Tris丙烷、1M NaCl、0.001% F-68,以及(v)用阴离子交换色谱平衡缓冲液平衡,所述平衡缓冲液含有18mM Bis-Tris丙烷、0.001% F-68。一旦平衡阴离子交换色谱柱,就将样品加载至柱上,其中加载pH为约9.0,并且加载电导率为2.1mS/cm。加载后,再次用阴离子交换色谱平衡缓冲液洗涤柱。首先用阴离子交换色谱平衡缓冲液洗脱样品,然后用阴离子交换色谱洗脱缓冲液洗脱。含有rAAV的级分的收集开始于A280处约大于4mAU的洗脱峰,并且结束于约小于15mAU的洗脱峰。然后使用CIM QA中和缓冲液中和来自阴离子交换色谱的洗脱级分,所述缓冲液含有0.6M Tris/HCL,pH为约6.0。除非另有指定,否则将阴离子交换色谱期间的缓冲液和样品以2L/min的体积流速加载至柱中。

[0200] 中和后,通过切向流过滤和超滤/透滤浓缩样品,其中加载密度为约 1.42×10^{17} vg/ m^2 病毒颗粒。过滤中使用的缓冲液含有Tris、 $MgCl_2$ 、NaCl和泊洛沙姆188。

[0201] 过滤的样品含有纯化的rAAV颗粒并且储存于-80°C下的BDS储存器中。BDS储备液含有约 3.0×10^{13} vg/mL的rAAV颗粒,并且可以稀释至大于 1.0×10^{13} vg/mL的DP浓度。包装前对样品进行无菌过滤。

[0202] 实施例5

[0203] 将昆虫细胞解冻并且以大于 3.0×10^5 个活细胞/mL(第1代,P1)接种于Express Five SFM中以建立种子培养物。将种子培养物中的细胞培养5代,然后接种至rAAV产生的主要生物反应中。

[0204] 在主要生物反应期间,通过将2L种子培养物与Express Five SFM以约 5.0×10^5 个细胞/mL的密度混合至10L总体积,将上述种子培养物移至N-2培养容器中。在N-2培养容器中培养细胞96小时,达到大于 6×10^6 vc/mL的培养密度和大于90%的活细胞。随后,将10L含细胞的N-2培养物移至N-1培养容器中,并且以约 1.2×10^6 vc/mL的起始细胞密度与Express Five SFM混合。N-1培养物还含有12% (v/v) 泊洛沙姆188溶液。通过添加更多的Express Five SFM,使N-1培养容器中的总体积达到50L。可以根据需要将消泡剂添加至培养物中。培养细胞72小时以达到大于 6×10^6 vc/mL的最终密度和大于90%的活细胞。

[0205] 在准备rBV感染时,将N-1培养物与IS SF培养基混合,并且补充有消泡剂和12% (v/v) 泊洛沙姆188溶液。将Express Five SFM添加至混合物中以达到所需的总体积。在此阶段混合物中Express Five SFM的比率为约50% (v/v)。起始细胞密度为约 1.5×10^6 。培养细胞96小时以达到 1.8×10^7 的细胞密度。然后用编码Rep/AAV9 Cap的rBV和编码靶基因(例如,GBA、PGRN、PSAP、TREM2或APOE)的rBV感染细胞,对于每个rBV,感染复数为约1.5个感染单位(IFU)/细胞。添加至培养物中的rBV中每一者的体积介于约5与26L之间,这取决于病毒

滴度。一旦将rBV添加至培养物中,就使用IS SF培养基调整培养物的总体积,使得混合物中Express Five SFM的百分比为40% (v/v)。在感染后约48小时,向培养物补充约5% (v/v)的产生促进添加剂(PBA)。在感染后约72小时收获细胞。

[0206] 收获时,在含有0.8% (w/v) Triton的Tris缓冲液中使昆虫细胞溶解。将细胞在溶解缓冲液中孵育约60分钟。在约2.2mM MgCl₂存在下,用浓度为约45IU/mL的苯宗酶处理细胞溶解产物约60分钟。用约300mM NaCl淬灭反应。细胞溶解产物含有被感染的昆虫细胞包装的rAAV。

[0207] 然后对所得细胞溶解产物进行澄清步骤。使用Millistak+® HC Pod深度过滤器、DOHC介质系列、1.1m²表面积(POD DOHC)通过深度过滤进行初步澄清,冲洗流速为约13L/min并且最大压力为约14psi。使用Millistak+® HC Pod深度过滤器、A1HC介质系列、0.11m²表面积(POD A1HC)通过深度过滤进一步澄清细胞溶解产物,冲洗流速为约11L/min并且压力为约14psi。随后,使用Express Five SFM对溶解产物进行调节和追踪,在澄清步骤之前得到约85%的细胞溶解产物。通过TFF浓缩细胞溶解产物。在TFF期间,细胞溶解产物经历水冲洗、透滤缓冲液(DF缓冲液)调节、DF缓冲液冲洗和DF缓冲液追踪。DF缓冲液含有20mM Tris、500mM NaCl和0.001%普朗尼克,并且具有8.5的pH。以4的浓缩因子进行DF缓冲液冲洗步骤。浓缩后的产率为TFF前溶解产物的约90%。

[0208] 使用Opticap XL10过滤器通过透滤对浓缩的细胞溶解产物进行无菌过滤。过滤后的细胞溶解产物产率为无菌过滤前细胞溶解产物的约95%。可以将细胞溶解产物冷冻并储存于-80°C下。

[0209] 在对rAAV进行色谱纯化之前,将细胞溶解产物解冻并使用Sartopore 2膜过滤。预先冲洗过滤器并用亲和纯化平衡缓冲液平衡。在约14.00psi和700mL/min的流速下进行过滤。过滤后,再次用亲和纯化平衡缓冲液冲洗过滤器。为了纯化rAAV,亲和纯化后进行阴离子交换纯化。

[0210] 衣壳特异性亲和纯化柱用于rAAV的亲和纯化。衣壳特异性亲和纯化树脂具有约3.4E+13vg/mL的负载能力。衣壳特异性亲和纯化树脂的总结合能力为约1.50E+17。向柱中注入注射用水(WFI),并且用0.08M磷酸进行酸洗提。然后使用120mM Tris和2.2M NaCl再生所述柱。再生后,使用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡,所述缓冲液含有约1.2mM柠檬酸、15mM磷酸盐、300mM NaCl、0.5%蔗糖、0.1% F-68。平衡后将细胞溶解产物加载至柱中,并且加载后再次用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡。通过使用洗涤缓冲液进行高盐洗涤,所述缓冲液含有约1.2mM柠檬酸、15mM磷酸盐、800mM NaCl、0.5%蔗糖、0.1% F-68。高盐洗涤后,在洗脱前用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡。亲和纯化色谱洗脱缓冲液含有18mM柠檬酸、300mM NaCl、0.5%蔗糖、0.1% F-68,pH为2.6。洗脱的rAAV的收集开始于A280处约大于60mAU的洗脱峰。洗脱后,对柱进行酸洗提并再生。使用5M盐酸胍以约55cm/h的线性流速清洗柱。然后用注射用水和储存缓冲液洗涤柱,所述缓冲液含有1.2mM柠檬酸、15mM磷酸盐、20%乙醇,线性流速为55cm/h。除非另有指定,否则将上文所描述的缓冲液和样品以约175cm/h的线性流速加载至柱中。然后使用磷酸盐缓冲液中和洗脱级分,所述缓冲液含有0.6M磷酸盐,pH为8.5。中和后洗脱级分的目标pH为7。

[0211] 在准备阴离子交换色谱时,使用Kleenpak过滤器过滤来自亲和色谱后的中和洗脱级分的样品,并且使用阴离子交换色谱平衡缓冲液稀释和平衡,所述缓冲液含有20mM Bis-

Tris丙烷、0.0012% F-68, pH 9.3, 并且电导率小于2.5mS/cm。柱的加载密度介于约 1.0×10^{13} 与 4.0×10^{13} vg/mL之间。在稀释洗脱级分之前, 通过以下步骤准备阴离子交换色谱柱: (i) 用注射用水洗涤, (ii) 用含有1M NaOH和1.5M NaCl的缓冲液消毒, (iii) 再次用注射用水洗涤, (iv) 用阴离子交换色谱洗脱缓冲液冲洗, 所述洗脱缓冲液含有20mM Bis-Tris丙烷、0.8M NaCl、0.001% F-68, 以及(v) 用阴离子交换色谱平衡缓冲液平衡, 所述平衡缓冲液含有20mM Bis-Tris丙烷、0.001% F-68。一旦平衡阴离子交换色谱柱, 就将样品加载至柱上, 其中加载pH为约9.3, 并且加载电导率为1.8mS/cm。加载后, 再次用阴离子交换色谱平衡缓冲液洗涤柱。首先用阴离子交换色谱平衡缓冲液洗脱样品, 然后用阴离子交换色谱洗脱缓冲液洗脱。含有rAAV的级分的收集开始于A280处约大于5mAU的洗脱峰, 并且结束于约小于20mAU的洗脱峰。然后使用CIM QA中和缓冲液中和来自阴离子交换色谱的洗脱级分, 所述缓冲液含有1M Tris/HCL, pH为约6.5。除非另有指定, 否则将阴离子交换色谱期间的缓冲液和样品以1.5L/min的体积流速加载至柱中。

[0212] 中和后, 通过TFF和超滤/透滤浓缩样品, 其中加载密度为约 1.37×10^{17} vg/m²病毒颗粒。过滤中使用的缓冲液含有Tris、MgCl₂、NaCl和泊洛沙姆188。

[0213] 过滤的样品含有纯化的rAAV颗粒并且储存于-80℃下的BDS储存器中。BDS储备液含有约 1×10^{13} vg/mL的rAAV颗粒, 并且可以稀释至大于 1.0×10^{13} vg/mL的DP浓度。包装前对样品进行无菌过滤。

[0214] 实施例6

[0215] 将昆虫细胞解冻并且以大于 3.0×10^5 个活细胞/mL (第1代, P1) 接种于Express Five SFM中以建立种子培养物。将种子培养物中的细胞培养6代, 然后接种至rAAV产生的主要生物反应中。

[0216] 在主要生物反应期间, 通过将2L种子培养物与Express Five SFM以约 4.0×10^5 个细胞/mL的密度混合至10L总体积, 将上述种子培养物移至N-2培养容器中。在N-2培养容器中培养细胞96小时, 达到大于 5.5×10^6 vc/mL的培养密度和大于90%的活细胞。随后, 将10L含细胞的N-2培养物移至N-1培养容器中, 并且以约 1.5×10^6 vc/mL的起始细胞密度与Express Five SFM混合。N-1培养物还含有10% (v/v) 泊洛沙姆188溶液。通过添加更多的Express Five SFM, 使N-1培养容器中的总体积达到50L。可以根据需要将消泡剂添加至培养物中。培养细胞72小时以达到大于 6×10^6 vc/mL的最终密度和大于90%的活细胞。

[0217] 在准备rBV感染时, 将N-1培养物与SF900 II SFM混合, 并且补充有消泡剂和10% (v/v) 泊洛沙姆188溶液。将Express Five SFM添加至混合物中以达到所需的总体积。在此阶段混合物中Express Five SFM的比率为约50% (v/v)。起始细胞密度为约 2×10^6 。培养细胞96小时以达到 2×10^7 的细胞密度。然后用编码Rep/AAV9 Cap的rBV和编码靶基因(例如, GBA、PGRN、PSAP、TREM2或APOE)的rBV感染细胞, 对于每个rBV, 感染复数为约1个感染单位(IFU)/细胞。添加至培养物中的rBV中每一者的体积介于约5与26L之间, 这取决于病毒滴度。一旦将rBV添加至培养物中, 就使用SF900 II SFM调整培养物的总体积, 使得混合物中Express Five SFM的百分比为40% (v/v)。在感染后约36小时, 向培养物补充约8% (v/v)的产生促进添加剂(PBA)。在感染后约72小时收获细胞。

[0218] 收获时, 在含有0.5% (w/v) Triton的Tris缓冲液中使昆虫细胞溶解。将细胞在溶解缓冲液中孵育约75分钟。在约2mM MgCl₂存在下, 用浓度为约60IU/mL的苯宗酶处理细胞

溶解产物约60分钟。用约200mM NaCl淬灭反应。细胞溶解产物含有被感染的昆虫细胞包装的rAAV。

[0219] 然后对所得细胞溶解产物进行澄清步骤。使用 Millistak+® HC Pod深度过滤器、D0HC介质系列、1.1m²表面积 (POD D0HC) 通过深度过滤进行初步澄清, 冲洗流速为约12L/min并且最大压力为约11psi。使用 Millistak+® HC Pod深度过滤器、A1HC介质系列、0.11m²表面积 (POD A1HC) 通过深度过滤进一步澄清细胞溶解产物, 冲洗流速为约11L/min并且压力为约11psi。随后, 使用Express Five SFM对溶解产物进行调节和追踪, 在澄清步骤之前得到约80%的细胞溶解产物。通过TFF浓缩细胞溶解产物。在TFF期间, 细胞溶解产物经历水冲洗、透滤缓冲液 (DF缓冲液) 调节、DF缓冲液冲洗和DF缓冲液追踪。DF缓冲液含有20mM Tris、500mM NaCl和0.001%普朗尼克, 并且具有8.0的pH。以6的浓缩因子进行DF缓冲液冲洗步骤。浓缩后的产率为TFF前溶解产物的约90%。

[0220] 使用Opticap XL10过滤器通过透滤对浓缩的细胞溶解产物进行无菌过滤。过滤后的细胞溶解产物产率为无菌过滤前细胞溶解产物的约95%。可以将细胞溶解产物冷冻并储存于-80℃下。

[0221] 在对rAAV进行色谱纯化之前, 将细胞溶解产物解冻并使用Sartopore 2膜过滤。预先冲洗过滤器并用亲和纯化平衡缓冲液平衡。在约11.00psi和720mL/min的流速下进行过滤。过滤后, 再次用亲和纯化平衡缓冲液冲洗过滤器。为了纯化rAAV, 亲和纯化后进行阴离子交换纯化。

[0222] 衣壳特异性亲和纯化柱用于rAAV的亲和纯化。衣壳特异性亲和纯化树脂具有约4E+13vg/mL的负载能力。衣壳特异性亲和纯化树脂的总结合能力为约1.50E+17。向柱中注入注射用水 (WFI), 并且用0.12M磷酸进行酸洗提。然后使用100mM Tris和1.8M NaCl再生所述柱。再生后, 使用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡, 所述缓冲液含有约1mM柠檬酸、20mM磷酸盐、400mM NaCl、0.5%蔗糖、0.1% F-68。平衡后将细胞溶解产物加载至柱中, 并且加载后再次用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡。通过使用洗涤缓冲液进行高盐洗涤, 所述缓冲液含有约1mM柠檬酸、20mM磷酸盐、800mM NaCl、0.5%蔗糖、0.1%F-68。高盐洗涤后, 在洗脱前用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡。亲和纯化色谱洗脱缓冲液含有14mM柠檬酸、400mM NaCl、0.5%蔗糖、0.1% F-68, pH为2.5。洗脱的rAAV的收集开始于A280处约大于40mAU的洗脱峰。洗脱后, 对柱进行酸洗提并再生。使用5M盐酸胍以约70cm/h的线性流速清洗柱。然后用注射用水和储存缓冲液洗涤柱, 所述缓冲液含有1mM柠檬酸、20mM磷酸盐、20%乙醇, 线性流速为70cm/h。除非另有指定, 否则将上文所描述的缓冲液和样品以约150cm/h的线性流速加载至柱中。然后使用磷酸盐缓冲液中和洗脱级分, 所述缓冲液含有0.3M磷酸盐, pH为9.0。中和后洗脱级分的目标pH为7.5。

[0223] 在准备阴离子交换色谱时, 使用Kleenpak过滤器过滤来自亲和和色谱后的中和洗脱级分的样品, 并且使用阴离子交换色谱平衡缓冲液稀释和平衡, 所述缓冲液含有12mM Bis-Tris丙烷、0.0012% F-68, pH 8.8, 并且电导率小于2mS/cm。柱的加载密度介于约1.0+E13与4.0+E13vg/mL之间。在稀释洗脱级分之前, 通过以下步骤准备阴离子交换色谱柱: (i) 用注射用水洗涤, (ii) 用含有1.2M NaOH和1.8M NaCl的缓冲液消毒, (iii) 再次用注射用水洗涤, (iv) 用阴离子交换色谱洗脱缓冲液冲洗, 所述洗脱缓冲液含有12mM Bis-Tris丙烷、1.5M NaCl、0.001%F-68, 以及(v) 用阴离子交换色谱平衡缓冲液平衡, 所述平衡缓冲液含

有12mM Bis-Tris丙烷、0.0012% F-68。一旦平衡阴离子交换色谱柱,就将样品加载至柱上,其中加载pH为约8.8,并且加载电导率为2.5mS/cm。加载后,再次用阴离子交换色谱平衡缓冲液洗涤柱。首先用阴离子交换色谱平衡缓冲液洗脱样品,然后用阴离子交换色谱洗脱缓冲液洗脱。含有rAAV的级分的收集开始于A280处约大于5mAU的洗脱峰,并且结束于约小于18mAU的洗脱峰。然后使用CIM QA中和缓冲液中和来自阴离子交换色谱的洗脱级分,所述缓冲液含有0.8MTris/HCL,pH为约5.8。除非另有指定,否则将阴离子交换色谱期间的缓冲液和样品以1.5L/min的体积流速加载至柱中。

[0224] 中和后,通过切向流过滤和超滤/透滤浓缩样品,其中加载密度为约 $1.4E+17$ vg/m²病毒颗粒。过滤中使用的缓冲液含有Tris、MgCl₂、NaCl和泊洛沙姆188。

[0225] 过滤的样品含有纯化的rAAV颗粒并且储存于-80℃下的BDS储存器中。BDS储备液含有约 $1E+13$ vg/mL的rAAV颗粒,并且可以稀释至大于 $1.0E+13$ vg/mL的DP浓度。包装前对样品进行无菌过滤。

[0226] 实施例7

[0227] 将昆虫细胞解冻并且以大于 $3.0E+05$ 个活细胞/mL(第1代,P1)接种于ESF-921中以建立种子培养物。将种子培养物中的细胞培养4代,然后接种至rAAV产生的主要生物反应中。

[0228] 在主要生物反应期间,通过将2L种子培养物与ESF-921以约 $3.0E+05$ 个细胞/mL的密度混合至10L总体积,将上述种子培养物移至N-2培养容器中。在N-2培养容器中培养细胞96小时,达到大于 $5.5E+06$ vc/mL的培养密度和大于80%的活细胞。随后,将10L含细胞的N-2培养物移至N-1培养容器中,并且以约 $1.5E+06$ vc/mL的起始细胞密度与ESF-921混合。N-1培养物还含有10%(v/v)泊洛沙姆188溶液。通过添加更多的ESF-921,使N-1培养容器中的总体积达到50L。可以根据需要将消泡剂添加至培养物中。培养细胞72小时以达到大于 $6.5E+06$ vc/mL的最终密度和大于80%的活细胞。

[0229] 在准备rBV感染时,将N-1培养物与baculoGROW混合,并且补充有消泡剂和10%(v/v)泊洛沙姆188溶液。将ESF-921添加至混合物中以达到所需的总体积。在此阶段混合物中ESF-921的比率为约40%(v/v)。起始细胞密度为约 $2E+06$ 。培养细胞96小时以达到 $1.5E+07$ 的细胞密度。然后用编码Rep/AAV9 Cap的rBV和编码靶基因(例如,GBA、PGRN、PSAP、TREM2或APOE)的rBV感染细胞,对于每个rBV,感染复数为约2个感染单位(IFU)/细胞。添加至培养物中的rBV中每一者的体积介于约5与26L之间,这取决于病毒滴度。一旦将rBV添加至培养物中,就使用baculoGROW调整培养物的总体积,使得混合物中ESF-921的百分比为40%(v/v)。在感染后约24小时,向培养物补充约5%(v/v)的产生促进添加剂(PBA)。在感染后约96小时收获细胞。

[0230] 收获时,在含有0.5%(w/v) Triton的Tris缓冲液中使昆虫细胞溶解。将细胞在溶解缓冲液中孵育约75分钟。在约2mM MgCl₂存在下,用浓度为约60IU/mL的苯宗酶处理细胞溶解产物约60分钟。用约200mM NaCl淬灭反应。细胞溶解产物含有被感染的昆虫细胞包装的rAAV。

[0231] 然后对所得细胞溶解产物进行澄清步骤。使用Millistak+®HC Pod深度过滤器、DOHC介质系列、 $1.1m^2$ 表面积(POD DOHC)通过深度过滤进行初步澄清,冲洗流速为约12L/min并且最大压力为约14psi。使用Millistak+®HC Pod深度过滤器、A1HC介质系列、 $0.11m^2$

表面积(POD A1HC)通过深度过滤进一步澄清细胞溶解产物,冲洗流速为约12L/min并且压力为约14psi。随后,使用ESF-921对溶解产物进行调节和追踪,在澄清步骤之前得到约80%的细胞溶解产物。通过TFF浓缩细胞溶解产物。在TFF期间,细胞溶解产物经历水冲洗、透滤缓冲液(DF缓冲液)调节、DF缓冲液冲洗和DF缓冲液追踪。DF缓冲液含有20mM Tris、500mM NaCl和0.001%普朗尼克,并且具有8.0的pH。以8的浓缩因子进行DF缓冲液冲洗步骤。浓缩后的产率为TFF前溶解产物的约80%。

[0232] 使用Opticap XL10过滤器通过透滤对浓缩的细胞溶解产物进行无菌过滤。过滤后的细胞溶解产物产率为无菌过滤前细胞溶解产物的约90%。可以将细胞溶解产物冷冻并储存于-80℃下。

[0233] 在对rAAV进行色谱纯化之前,将细胞溶解产物解冻并使用Sartopore 2膜过滤。预先冲洗过滤器并用亲和纯化平衡缓冲液平衡。在约14.00psi和750mL/min的流速下进行过滤。过滤后,再次用亲和纯化平衡缓冲液冲洗过滤器。为了纯化rAAV,亲和纯化后进行阴离子交换纯化。

[0234] 衣壳特异性亲和纯化柱用于rAAV的亲和纯化。衣壳特异性亲和纯化树脂具有约 $3E+13$ vg/mL的负载能力。衣壳特异性亲和纯化树脂的总结合能力为约 $1.60E+17$ 。向柱中注入注射用水(WFI),并且用0.12M磷酸进行酸洗提。然后使用120mM Tris和1.8M NaCl再生所述柱。再生后,使用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡,所述缓冲液含有约1.2mM柠檬酸、16mM磷酸盐、350mM NaCl、0.4%蔗糖、0.1% F-68。平衡后将细胞溶解产物加载至柱中,并且加载后再次用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡。通过使用洗涤缓冲液进行高盐洗涤,所述缓冲液含有约1.2mM柠檬酸、16mM磷酸盐、1000mM NaCl、0.5%蔗糖、0.1% F-68。高盐洗涤后,在洗脱前用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡。亲和纯化色谱洗脱缓冲液含有18mM柠檬酸、350mM NaCl、0.4%蔗糖、0.1% F-68,pH为2.2。洗脱的rAAV的收集开始于A280处约大于50mAU的洗脱峰。洗脱后,对柱进行酸洗提并再生。使用6M盐酸胍以约50cm/h的线性流速清洗柱。然后用注射用水和储存缓冲液洗涤柱,所述缓冲液含有1.2mM柠檬酸、16mM磷酸盐、20%乙醇,线性流速为50cm/h。除非另有指定,否则将上文所描述的缓冲液和样品以约130cm/h的线性流速加载至柱中。然后使用磷酸盐缓冲液中和洗脱级分,所述缓冲液含有0.3M磷酸盐,pH为9.5。中和后洗脱级分的目标pH为7.5。

[0235] 在准备阴离子交换色谱时,使用Kleenpak过滤器过滤来自亲和色谱后的中和洗脱级分的样品,并且使用阴离子交换色谱平衡缓冲液稀释和平衡,所述缓冲液含有18mM Bis-Tris丙烷、0.0012% F-68,pH 9.2,并且电导率小于3mS/cm。柱的加载密度介于约 $1.0+E13$ 与 $4.0+E13$ vg/mL之间。在稀释洗脱级分之前,通过以下步骤准备阴离子交换色谱柱:(i)用注射用水洗涤,(ii)用含有1M NaOH和1.8M NaCl的缓冲液消毒,(iii)再次用注射用水洗涤,(iv)用阴离子交换色谱洗脱缓冲液冲洗,所述洗脱缓冲液含有18mM Bis-Tris丙烷、1M NaCl、0.001% F-68,以及(v)用阴离子交换色谱平衡缓冲液平衡,所述平衡缓冲液含有18mM Bis-Tris丙烷、0.001% F-68。一旦平衡阴离子交换色谱柱,就将样品加载至柱上,其中加载pH为约9.2,并且加载电导率为3mS/cm。加载后,再次用阴离子交换色谱平衡缓冲液洗涤柱。首先用阴离子交换色谱平衡缓冲液洗脱样品,然后用阴离子交换色谱洗脱缓冲液洗脱。含有rAAV的级分的收集开始于A280处约大于5mAU的洗脱峰,并且结束于约小于18mAU的洗脱峰。然后使用CIM QA中和缓冲液中和来自阴离子交换色谱的洗脱级分,所述缓冲液

含有0.8M Tris/HCL,pH为约5.8。除非另有指定,否则将阴离子交换色谱期间的缓冲液和样品以1.5L/min的体积流速加载至柱中。

[0236] 中和后,通过切向流过滤和超滤/透滤浓缩样品,其中加载密度为约 $1.4E+17\text{vg}/\text{m}^2$ 病毒颗粒。过滤中使用的缓冲液含有Tris、 MgCl_2 、NaCl和泊洛沙姆188。

[0237] 过滤的样品含有纯化的rAAV颗粒并且储存于 -80°C 下的BDS储存器中。BDS储备液含有约 $1E+13\text{vg}/\text{mL}$ 的rAAV颗粒,并且可以稀释至大于 $1.0E+13\text{vg}/\text{mL}$ 的DP浓度。包装前对样品进行无菌过滤。

[0238] 实施例8

[0239] 将昆虫细胞解冻并且以大于 $3.0E+05$ 个活细胞/mL(第1代,P1)接种于baculoGROW中以建立种子培养物。将种子培养物中的细胞培养6代,然后接种至rAAV产生的主要生物反应中。

[0240] 在主要生物反应期间,通过将2L种子培养物与baculoGROW以约 $3.0E+05$ 个细胞/mL的密度混合至10L总体积,将上述种子培养物移至N-2培养容器中。在N-2培养容器中培养细胞96小时,达到大于 $5.5E+06\text{vc}/\text{mL}$ 的培养密度和大于90%的活细胞。随后,将10L含细胞的N-2培养物移至N-1培养容器中,并且以约 $1.5E+06\text{vc}/\text{mL}$ 的起始细胞密度与baculoGROW混合。N-1培养物还含有5% (v/v) 泊洛沙姆188溶液。通过添加更多的baculoGROW,使N-1培养容器中的总体积达到50L。可以根据需要将消泡剂添加至培养物中。培养细胞72小时以达到大于 $6.5E+06\text{vc}/\text{mL}$ 的最终密度和大于90%的活细胞。

[0241] 在准备rBV感染时,将N-1培养物与ESF AF混合,并且补充有消泡剂和5% (v/v) 泊洛沙姆188溶液。将baculoGROW添加至混合物中以达到所需的总体积。在此阶段混合物中baculoGROW的比率为约30% (v/v)。起始细胞密度为约 $2E+06$ 。培养细胞96小时以达到 $1.5E+07$ 的细胞密度。然后用编码Rep/AAV9 Cap的rBV和编码靶基因(例如,GBA、PGRN、PSAP、TREM2或APOE)的rBV感染细胞,对于每个rBV,感染复数为约1.8个感染单位(IFU)/细胞。添加至培养物中的rBV中每一者的体积介于约5与26L之间,这取决于病毒滴度。一旦将rBV添加至培养物中,就使用ESF AF调整培养物的总体积,使得混合物中baculoGROW的百分比为40% (v/v)。在感染后约36小时,向培养物补充约8% (v/v)的产生促进添加剂(PBA)。在感染后约120小时收获细胞。

[0242] 收获时,在含有0.8% (w/v) Triton的Tris缓冲液中使昆虫细胞溶解。将细胞在溶解缓冲液中孵育约60分钟。在约 2.5mM MgCl_2 存在下,用浓度为约 $60\text{IU}/\text{mL}$ 的苯宗酶处理细胞溶解产物约60分钟。用约 280mM NaCl淬灭反应。细胞溶解产物含有被感染的昆虫细胞包装的rAAV。

[0243] 然后对所得细胞溶解产物进行澄清步骤。使用Millistak+[®] HC Pod深度过滤器、DOHC介质系列、 1.1m^2 表面积(POD DOHC)通过深度过滤进行初步澄清,冲洗流速为约 $15\text{L}/\text{min}$ 并且最大压力约小于12psi。使用Millistak+[®] HC Pod深度过滤器、A1HC介质系列、 0.11m^2 表面积(POD A1HC)通过深度过滤进一步澄清细胞溶解产物,冲洗流速为约 $15\text{L}/\text{min}$ 并且压力约小于12psi。随后,使用baculoGROW对溶解产物进行调节和追踪,在澄清步骤之前得到约85%的细胞溶解产物。通过TFF浓缩细胞溶解产物。在TFF期间,细胞溶解产物经历水冲洗、透滤缓冲液(DF缓冲液)调节、DF缓冲液冲洗和DF缓冲液追踪。DF缓冲液含有 20mM Tris、 500mM NaCl和0.001%普朗尼克,并且具有8.0的pH。以3的浓缩因子进行DF缓冲液冲

洗步骤。浓缩后的产率为TFF前溶解产物的约75%。

[0244] 使用Opticap XL10过滤器通过透滤对浓缩的细胞溶解产物进行无菌过滤。过滤后的细胞溶解产物产率为无菌过滤前细胞溶解产物的约80%。可以将细胞溶解产物冷冻并储存于-80℃下。

[0245] 在对rAAV进行色谱纯化之前,将细胞溶解产物解冻并使用Sartopore 2膜过滤。预先冲洗过滤器并用亲和纯化平衡缓冲液平衡。在约小于12.00psi和780mL/min的流速下进行过滤。过滤后,再次用亲和纯化平衡缓冲液冲洗过滤器。为了纯化rAAV,亲和纯化后进行阴离子交换纯化。

[0246] 衣壳特异性亲和纯化柱用于rAAV的亲和纯化。衣壳特异性亲和纯化树脂具有约 $2.5E+13$ vg/mL的负载能力。衣壳特异性亲和纯化树脂的总结合能力为约 $1E+17$ 。向柱中注入注射用水(WFI),并且用0.12M磷酸进行酸洗提。然后使用100mM Tris和1.8M NaCl再生所述柱。再生后,使用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡,所述缓冲液含有约1mM柠檬酸、22mM磷酸盐、320mM NaCl、0.5%蔗糖、0.1% F-68。平衡后将细胞溶解产物加载至柱中,并且加载后再次用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡。通过使用洗涤缓冲液进行高盐洗涤,所述缓冲液含有约1mM柠檬酸、22mM磷酸盐、1000mM NaCl、0.5%蔗糖、0.1% F-68。高盐洗涤后,在洗脱前用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡。亲和纯化色谱洗脱缓冲液含有15mM柠檬酸、320mM NaCl、0.5%蔗糖、0.1% F-68,pH为2.5。洗脱的rAAV的收集开始于A280处约大于50mAU的洗脱峰。洗脱后,对柱进行酸洗提并再生。使用6M盐酸胍以约60cm/h的线性流速清洗柱。然后用注射用水和储存缓冲液洗涤柱,所述缓冲液含有1mM柠檬酸、22mM磷酸盐、20%乙醇,线性流速为70cm/h。除非另有指定,否则将上文所描述的缓冲液和样品以约150cm/h的线性流速加载至柱中。然后使用磷酸盐缓冲液中和洗脱级分,所述缓冲液含有0.5M磷酸盐,pH为8.5。中和后洗脱级分的目标pH为7.5。

[0247] 在准备阴离子交换色谱时,使用Kleenpak过滤器过滤来自亲和色谱后的中和洗脱级分的样品,并且使用阴离子交换色谱平衡缓冲液稀释和平衡,所述缓冲液含有22mM Bis-Tris丙烷、0.001% F-68,pH 9.2,并且电导率小于3mS/cm。柱的加载密度介于约 $1.0+E13$ 与 $4.0+E13$ vg/mL之间。在稀释洗脱级分之前,通过以下步骤准备阴离子交换色谱柱:(i)用注射用水洗涤,(ii)用含有1M NaOH和1.8M NaCl的缓冲液消毒,(iii)再次用注射用水洗涤,(iv)用阴离子交换色谱洗脱缓冲液冲洗,所述洗脱缓冲液含有22mM Bis-Tris丙烷、1.8M NaCl、0.001% F-68,以及(v)用阴离子交换色谱平衡缓冲液平衡,所述平衡缓冲液含有22mM Bis-Tris丙烷、0.0012% F-68。一旦平衡阴离子交换色谱柱,就将样品加载至柱上,其中加载pH为约9.2,并且加载电导率为2mS/cm。加载后,再次用阴离子交换色谱平衡缓冲液洗涤柱。首先用阴离子交换色谱平衡缓冲液洗脱样品,然后用阴离子交换色谱洗脱缓冲液洗脱。含有rAAV的级分的收集开始于A280处约大于5mAU的洗脱峰,并且结束于约小于15mAU的洗脱峰。然后使用CIM QA中和缓冲液中和来自阴离子交换色谱的洗脱级分,所述缓冲液含有0.5M Tris/HCL,pH为约6。除非另有指定,否则将阴离子交换色谱期间的缓冲液和样品以1.5L/min的体积流速加载至柱中。

[0248] 中和后,通过切向流过滤和超滤/透滤浓缩样品,其中加载密度为约 $1.4E+17$ vg/m²病毒颗粒。过滤中使用的缓冲液含有Tris、MgCl₂、NaCl和泊洛沙姆188。

[0249] 过滤的样品含有纯化的rAAV颗粒并且储存于-80℃下的BDS储存器中。BDS储备液

含有约 $1\text{E}+13\text{vg/mL}$ 的rAAV颗粒,并且可以稀释至大于 $1.0\text{E}+13\text{vg/mL}$ 的DP浓度。包装前对样品进行无菌过滤。

[0250] 实施例9

[0251] 将昆虫细胞解冻并且以大于 $3.0\text{E}+05$ 个活细胞/mL(第1代,P1)接种于ExpiSf CD培养基中以建立种子培养物。将种子培养物中的细胞培养5代,然后接种至rAAV产生的主要生物反应中。

[0252] 在主要生物反应期间,通过将2L种子培养物与ExpiSf CD培养基以约 $6.0\text{E}+05$ 个细胞/mL的密度混合至10L总体积,将上述种子培养物移至N-2培养容器中。在N-2培养容器中培养细胞96小时,达到大于 $6\text{E}+06\text{vc/mL}$ 的培养密度和大于90%的活细胞。随后,将10L含细胞的N-2培养物移至N-1培养容器中,并且以约 $1.5\text{E}+06\text{vc/mL}$ 的起始细胞密度与ExpiSf CD培养基混合。N-1培养物还含有10% (v/v) 泊洛沙姆188溶液。通过添加更多的ExpiSf CD培养基,使N-1培养容器中的总体积达到50L。可以根据需要将消泡剂添加至培养物中。培养细胞72小时以达到大于 $6\text{E}+06\text{vc/mL}$ 的最终密度和大于85%的活细胞。

[0253] 在准备重组杆状病毒(rBV)感染时,将N-1培养物与SF900 II SFM混合,并且补充有消泡剂和10% (v/v) 泊洛沙姆188溶液。将ExpiSf CD培养基添加至混合物中以达到所需的总体积。在此阶段混合物中ExpiSf CD培养基的比率为约40% (v/v)。起始细胞密度为约 $2\text{E}+06$ 。培养细胞96小时以达到 $1.5\text{E}+07$ 的细胞密度。然后用编码Rep/AAV9 Cap的rBV和编码靶基因(例如,GBA、PGRN、PSAP、TREM2或APOE)的rBV感染细胞,对于每个rBV,感染复数为约1.6个感染单位(IFU)/细胞。添加至培养物中的rBV中每一者的体积介于约5与26L之间,这取决于病毒滴度。一旦将rBV添加至培养物中,就使用SF900 II SFM调整培养物的总体积,使得混合物中ExpiSf CD培养基的百分比为40% (v/v)。在感染后约20小时,向培养物补充约8% (v/v)的产生促进添加剂(PBA)。在感染后约60小时收获细胞。

[0254] 收获时,在含有0.4% (w/v) Triton的Tris缓冲液中使昆虫细胞溶解。将细胞在溶解缓冲液中孵育约75分钟。在约 2.5mM MgCl_2 存在下,用浓度为约50IU/mL的苯宗酶处理细胞溶解产物约60分钟。用约 150mM NaCl 淬灭反应。细胞溶解产物含有被感染的昆虫细胞包装的rAAV。

[0255] 然后对所得细胞溶解产物进行澄清步骤。使用Millistak+[®]HC Pod深度过滤器、DOHC介质系列、 1.1m^2 表面积(POD DOHC)通过深度过滤进行初步澄清,冲洗流速为约 15L/min 并且最大压力为约13psi。使用Millistak+[®]HC Pod深度过滤器、A1HC介质系列、 0.11m^2 表面积(POD A1HC)通过深度过滤进一步澄清细胞溶解产物,冲洗流速为约 12L/min 并且压力为约13psi。随后,使用ExpiSf CD培养基对溶解产物进行调节和追踪,在澄清步骤之前得到约95%的细胞溶解产物。通过切向流过滤(TFF)浓缩细胞溶解产物。在TFF期间,细胞溶解产物经历水冲洗、透滤缓冲液(DF缓冲液)调节、DF缓冲液冲洗和DF缓冲液追踪。DF缓冲液含有 20mM Tris 、 500mM NaCl 和0.001%普朗尼克,并且具有8.0的pH。以6的浓缩因子进行DF缓冲液冲洗步骤。浓缩后的产率为TFF前溶解产物的约75%。

[0256] 使用Opticap XL10过滤器通过透滤对浓缩的细胞溶解产物进行无菌过滤。过滤后的细胞溶解产物产率为无菌过滤前细胞溶解产物的约95%。可以将细胞溶解产物冷冻并储存于 -80°C 下。

[0257] 在对rAAV进行色谱纯化之前,将细胞溶解产物解冻并使用Sartopore 2膜过滤。预

先冲洗过滤器并用亲和纯化平衡缓冲液平衡。在约13.00psi和720mL/min的流速下进行过滤。过滤后,再次用亲和纯化平衡缓冲液冲洗过滤器。为了纯化rAAV,亲和纯化后进行阴离子交换纯化。

[0258] 衣壳特异性亲和纯化柱用于rAAV的亲和纯化。衣壳特异性亲和纯化树脂具有约 $3.4E+13$ vg/mL的负载能力。衣壳特异性亲和纯化树脂的总结合能力为约 $1E+17$ 。向柱中注入注射用水(WFI),并且用0.12M磷酸进行酸洗提。然后使用90mM Tris和1.8M NaCl再生所述柱。再生后,使用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡,所述缓冲液含有约1.5mM柠檬酸、22mM磷酸盐、360mM NaCl、0.5%蔗糖、0.2% F-68。平衡后将细胞溶解产物加载至柱中,并且加载后再次用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡。通过使用洗涤缓冲液进行高盐洗涤,所述缓冲液含有约1.5mM柠檬酸、22mM磷酸盐、1500mM NaCl、0.5%蔗糖、0.1% F-68。高盐洗涤后,在洗脱前用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡。亲和纯化色谱洗脱缓冲液含有18mM柠檬酸、360mM NaCl、0.5%蔗糖、0.2% F-68,pH为2.5。洗脱的rAAV的收集开始于A280处约大于30mAU的洗脱峰。洗脱后,对柱进行酸洗提并再生。使用6M盐酸胍以约80cm/h的线性流速清洗柱。然后用注射用水和储存缓冲液洗涤柱,所述缓冲液含有1.5mM柠檬酸、22mM磷酸盐、20%乙醇,线性流速为80cm/h。除非另有指定,否则将上文所描述的缓冲液和样品以约120cm/h的线性流速加载至柱中。然后使用磷酸盐缓冲液中和洗脱级分,所述缓冲液含有0.5M磷酸盐,pH为8.5。中和后洗脱级分的目标pH为6.8。

[0259] 在准备阴离子交换色谱时,使用Kleenpak过滤器过滤来自亲和色谱后的中和洗脱级分的样品,并且使用阴离子交换色谱平衡缓冲液稀释和平衡,所述缓冲液含有20mM Bis-Tris丙烷、0.001% F-68,pH 8.8,并且电导率小于2.5mS/cm。柱的加载密度介于约 $1.0+E13$ 与 $4.0+E13$ vg/mL之间。在稀释洗脱级分之前,通过以下步骤准备阴离子交换色谱柱:(i)用注射用水洗涤,(ii)用含有1M NaOH和1.8M NaCl的缓冲液消毒,(iii)再次用注射用水洗涤,(iv)用阴离子交换色谱洗脱缓冲液冲洗,所述洗脱缓冲液含有20mM Bis-Tris丙烷、1.8M NaCl、0.001% F-68,以及(v)用阴离子交换色谱平衡缓冲液平衡,所述平衡缓冲液含有20mM Bis-Tris丙烷、0.0012% F-68。一旦平衡阴离子交换色谱柱,就将样品加载至柱上,其中加载pH为约8.8,并且加载电导率为2.5mS/cm。加载后,再次用阴离子交换色谱平衡缓冲液洗涤柱。首先用阴离子交换色谱平衡缓冲液洗脱样品,然后用阴离子交换色谱洗脱缓冲液洗脱。含有rAAV的级分的收集开始于A280处约大于5mAU的洗脱峰,并且结束于约小于15mAU的洗脱峰。然后使用CIM QA中和缓冲液中和来自阴离子交换色谱的洗脱级分,所述缓冲液含有1M Tris/HCL,pH为约6。除非另有指定,否则将阴离子交换色谱期间的缓冲液和样品以1.5L/min的体积流速加载至柱中。

[0260] 中和后,通过切向流过滤和超滤/透滤浓缩样品,其中加载密度为约 $1.39E+17$ vg/ m^2 病毒颗粒。过滤中使用的缓冲液含有Tris、 $MgCl_2$ 、NaCl和泊洛沙姆188。

[0261] 过滤的样品含有纯化的rAAV颗粒并且储存于-80℃下的BDS储存器中。BDS储备液含有约 $3.0E+13$ vg/mL的rAAV颗粒,并且可以稀释至大于 $1.0E+13$ vg/mL的DP浓度。包装前对样品进行无菌过滤。

[0262] 实施例10

[0263] 将昆虫细胞解冻并且以大于 $3.0E+05$ 个活细胞/mL(第1代,P1)接种于SF900 II SFM中以建立种子培养物。将种子培养物中的细胞培养5代,然后接种至rAAV产生的主要生

物反应中。

[0264] 在主要生物反应期间,通过将2L种子培养物与SF900 II SFM以约 $4.8E+05$ 个细胞/mL的密度混合至10L总体积,将上述种子培养物移至N-2培养容器中。在N-2培养容器中培养细胞96小时,达到大于 $4.8E+06$ vc/mL的培养密度和大于90%的活细胞。随后,将10L含细胞的N-2培养物移至N-1培养容器中,并且以约 $2E+06$ vc/mL的起始细胞密度与SF-900II SFM混合。N-1培养物还含有8% (v/v) 泊洛沙姆188溶液。通过添加更多的SF900 II SFM,使N-1培养容器中的总体积达到50L。可以根据需要将消泡剂添加至培养物中。培养细胞72小时以达到大于 $6E+06$ vc/mL的最终密度和大于90%的活细胞。

[0265] 在准备rBV感染时,将N-1培养物与IS SF混合,并且补充有消泡剂和8% (v/v) 泊洛沙姆188溶液。将SF900 II SFM添加至混合物中以达到所需的总体积。在此阶段混合物中SF900 II SFM的比率为约45% (v/v)。起始细胞密度为约 $2E+06$ 。培养细胞96小时以达到 $1.5E+07$ 的细胞密度。然后用编码Rep/AAV9 Cap的rBV和编码靶基因(例如,GBA、PGRN、PSAP、TREM2或APOE)的rBV感染细胞,对于每个rBV,感染复数为约1.5个感染单位(IFU)/细胞。添加至培养物中的rBV中每一者的体积介于约5与26L之间,这取决于病毒滴度。一旦将rBV添加至培养物中,就使用IS SF调整培养物的总体积,使得混合物中SF900 II SFM的百分比为40% (v/v)。在感染后约18小时,向培养物补充约8% (v/v) 的产生促进添加剂(PBA)。在感染后约72小时收获细胞。

[0266] 收获时,在含有0.5% (w/v) Triton的Tris缓冲液中使昆虫细胞溶解。将细胞在溶解缓冲液中孵育约75分钟。在约 2.5mM MgCl_2 存在下,用浓度为约50IU/mL的苯宗酶处理细胞溶解产物约60分钟。用约 280mM NaCl 淬灭反应。细胞溶解产物含有被感染的昆虫细胞包装的rAAV。

[0267] 然后对所得细胞溶解产物进行澄清步骤。使用Millistak+[®] HC Pod深度过滤器、D0HC介质系列、 1.1m^2 表面积(POD D0HC)通过深度过滤进行初步澄清,冲洗流速为约20L/min并且最大压力为约11psi。使用Millistak+[®] HC Pod深度过滤器、A1HC介质系列、 0.11m^2 表面积(POD A1HC)通过深度过滤进一步澄清细胞溶解产物,冲洗流速为约20L/min并且压力为约11psi。随后,使用SF900 II SFM对溶解产物进行调节和追踪,在澄清步骤之前得到约95%的细胞溶解产物。通过TFF浓缩细胞溶解产物。在TFF期间,细胞溶解产物经历水冲洗、透滤缓冲液(DF缓冲液)调节、DF缓冲液冲洗和DF缓冲液追踪。DF缓冲液含有20mM Tris、500mM NaCl和0.001%普朗尼克,并且具有8.0的pH。以6的浓缩因子进行DF缓冲液冲洗步骤。浓缩后的产率为TFF前溶解产物的约90%。

[0268] 使用Opticap XL10过滤器通过透滤对浓缩的细胞溶解产物进行无菌过滤。过滤后的细胞溶解产物产率为无菌过滤前细胞溶解产物的约95%。可以将细胞溶解产物冷冻并储存于 -80°C 下。

[0269] 在对rAAV进行色谱纯化之前,将细胞溶解产物解冻并使用Sartopore 2膜过滤。预先冲洗过滤器并用亲和纯化平衡缓冲液平衡。在约13.00psi和750mL/min的流速下进行过滤。过滤后,再次用亲和纯化平衡缓冲液冲洗过滤器。为了纯化rAAV,亲和纯化后进行阴离子交换纯化。

[0270] 衣壳特异性亲和纯化柱用于rAAV的亲和纯化。衣壳特异性亲和纯化树脂具有约 $4E+13$ vg/mL的负载能力。衣壳特异性亲和纯化树脂的总结合能力为约 $2E+17$ 。向柱中注入注射

用水(WFI),并且用0.06M磷酸进行酸洗提。然后使用100mM Tris和1.8M NaCl再生所述柱。再生后,使用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡,所述缓冲液含有约1.2mM柠檬酸、20mM磷酸盐、360mM NaCl、0.5%蔗糖、0.2% F-68。平衡后将细胞溶解产物加载至柱中,并且加载后再次用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡。通过使用洗涤缓冲液进行高盐洗涤,所述缓冲液含有约1.2mM柠檬酸、20mM磷酸盐、1200mM NaCl、0.5%蔗糖、0.2% F-68。高盐洗涤后,在洗脱前用亲和纯化平衡缓冲液对柱进行平衡。亲和纯化色谱洗脱缓冲液含有20mM柠檬酸、360mM NaCl、0.5%蔗糖、0.2% F-68,pH为2.2。洗脱的rAAV的收集开始于A280处约大于50mAU的洗脱峰。洗脱后,对柱进行酸洗提并再生。使用4M盐酸胍以约75cm/h的线性流速清洗柱。然后用注射用水和储存缓冲液洗涤柱,所述缓冲液含有1.2mM柠檬酸、20mM磷酸盐、20%乙醇,线性流速为75cm/h。除非另有指定,否则将上文所描述的缓冲液和样品以约120cm/h的线性流速加载至柱中。然后使用磷酸盐缓冲液中和洗脱级分,所述缓冲液含有0.4M磷酸盐,pH为9.0。中和后洗脱级分的目标pH为7.5。

[0271] 在准备阴离子交换色谱时,使用Kleenpak过滤器过滤来自亲和色谱后的中和洗脱级分的样品,并且使用阴离子交换色谱平衡缓冲液稀释和平衡,所述缓冲液含有18mM Bis-Tris丙烷、0.0015% F-68,pH 9,并且电导率小于2mS/cm。柱的加载密度介于约 1.0×10^{13} 与 4.0×10^{13} vg/mL之间。在稀释洗脱级分之前,通过以下步骤准备阴离子交换色谱柱:(i)用注射用水洗涤,(ii)用含有1M NaOH和1.2M NaCl的缓冲液消毒,(iii)再次用注射用水洗涤,(iv)用阴离子交换色谱洗脱缓冲液冲洗,所述洗脱缓冲液含有18mM Bis-Tris丙烷、1.2M NaCl、0.0015%F-68,以及(v)用阴离子交换色谱平衡缓冲液平衡,所述平衡缓冲液含有18mM Bis-Tris丙烷、0.0015% F-68。一旦平衡阴离子交换色谱柱,就将样品加载至柱上,其中加载pH为约9,并且加载电导率为2.3mS/cm。加载后,再次用阴离子交换色谱平衡缓冲液洗涤柱。首先用阴离子交换色谱平衡缓冲液洗脱样品,然后用阴离子交换色谱洗脱缓冲液洗脱。含有rAAV的级分的收集开始于A280处约大于5mAU的洗脱峰,并且结束于约小于15mAU的洗脱峰。然后使用CIM QA中和缓冲液中和来自阴离子交换色谱的洗脱级分,所述缓冲液含有0.6MTris/HCL,pH为约6.2。除非另有指定,否则将阴离子交换色谱期间的缓冲液和样品以1.5L/min的体积流速加载至柱中。

[0272] 中和后,通过TFF和超滤/透滤浓缩样品,其中加载密度为约 1.8×10^{17} vg/m²病毒颗粒。过滤中使用的缓冲液含有Tris、MgCl₂、NaCl和泊洛沙姆188。

[0273] 过滤的样品含有纯化的rAAV颗粒并且储存于-80℃下的BDS储存器中。BDS储备液含有约 1.5×10^{13} vg/mL的rAAV颗粒,并且可以稀释至大于 1.0×10^{13} vg/mL的DP浓度。包装前对样品进行无菌过滤。

[0274] 实施例11:定量PCR测定以测量编码葡糖脑苷脂酶的rAAV的物理滴度。

[0275] 本测定的目的是使用定量PCR(qPCR)通过与已知标准进行比较来定量编码GCase的AAV(例如,AAV9)封装载体的物理滴度。本测试方法可以用于定量纯化的AAV病毒样品或过程产生级分中的物理载体基因组滴度。

[0276] 实验室测试方法

[0277] 表1:材料

材料描述	制造商	项目号
PerfeCTa qPCR 与 ROX 的超混物	QuantaBio	95051-500
超纯蒸馏水(DIW)	Invitrogen	10977-023 或等效物
MicroAmp 光学 96 孔反应	Applied Biosystems	43-067-37
OctaPool™ 储液罐, 25ml 一次性, 无菌	Thomas Scientific	1159X93 或等效物
DNA Away	Fisher Scientific	M0303L 或等效物
PCR 8 孔管条和管盖	VWR	2017-004
Eppendorf DNA LoBind 微量离心管 1.5ml	Eppendorf	022431021
Tween-80 (聚山梨醇酯 80)	VWR	JT4117-02
蛋白酶 K, 20mg/mL	Promega	MC5005
20% SDS 溶液	Fisher Scientific	BP1311-1 或等效物
0.5M EDTA pH 8.0	Fisher Scientific	BP2482 或等效物
TE 缓冲液, pH 8.0	Fisher Scientific	AM9849 或等效物
Falcon 锥形管 15ml	Fisher Scientific	14 959 53A 或等效物
Falcon 锥形管 50ml	Fisher Scientific	14 432 22 或等效物
DNase I (无 RNase)	New England BioLabs	M0303S
Lambda Hind III 消化 DNA	New England BioLabs	B7025

[0279] 表2: 设备

设备描述	制造商	项目号
QuantStudio™ 7 Flex	Applied Biosystems	4485695
移液组 LTS Pipet-Lite XLS+手册 (P2,P20,P200,P1000)	Rainin	30386597
组合 PCR 工作站	AirClean™ Systems	AC632LFUVC
Sorvall ST8R 离心机	Fisher Scientific	75 230 395
Myspin 6 微型离心机	Fisher Scientific	75 004 061 或等效物
微型涡旋混合器	Fisher Scientific	400815B 或等效物
Simpliamp PCR 热循环仪	Thermo Fisher	A24811 或等效物

[0281] 将编码GCCase的线性化质粒用DraIII线性化。病毒参考标准是编码GCCase的不同rAAV载体。

[0282] 表3: 引物

引物或探针	名称	序列
正向引物	Cov PR001-1_F	GAC TGT GGG ATC CGT TCG AA (SEQ ID NO: 6)
反向引物	Cov PR001-1_R	GAT TGA CAC CCG GCT CAG A (SEQ ID NO: 7)
TaqMan 探针	Cov PR001-2 探针	6FAM-CCA TGG AAT TCA GCA GCC CCA GC (SEQ ID NO: 8)-TAMRA

[0284] 注意: 假定所有引物均由供应商以100μM提供, 并且具有HPLC级纯度或更高纯度。

[0285] 背景/方法理论: 为了确定封装靶序列的AAV拷贝量, 使用利用实时qPCR的PCR扩增所需序列。在本方法中, 使用荧光报告分子(诸如染料标记的探针)来监测扩增反应的进程。在每个扩增循环中, 荧光强度的增加与扩增子浓度的增加成比例, 其中qPCR仪器系统在每个PCR循环期间收集每个样品的数据。然后将所有样品的荧光对比循环数的结果图与它们的背景荧光一起设置在共同的起点。扩增曲线超过预定背景阈值荧光水平时的循环数称为

“Ct”或阈值循环。通过将未知物的Ct值与以各种浓度稀释的已知标准进行比较,确定未知样品的起始浓度,从而在给定样品中产生所需拷贝量(如果存在的话)。

[0286] 程序

[0287] 制备10%聚山梨醇酯80、PCR稀释缓冲液、10X蛋白酶K缓冲液和标准稀释剂。如有需要,将线性化质粒稀释至 2×10^9 个拷贝/ μL 。使用第一标准在标准稀释剂中进行10倍连续稀释,以制定范围为 2×10^7 个拷贝/ μL 至20个拷贝/ μL 的标准曲线。将一组标准(2×10^7 至20个拷贝/ μL)等分至8孔0.2mL PCR管条的7个孔中,使得每个管条用作一次性标准曲线。由冻干的引物制备引物储备液。

[0288] 制备空白和DNase对照。制备参考标准和样品。所有样品和参考标准都一式三份操作。基于根据表4的初始浓度来选择所有样品类型的样品稀释度。可以在针对以下理论样品浓度所提议的最高稀释度下操作过程中的样品。

[0289] 表4:样品和参考标准稀释程序

理论样品浓度(拷贝/mL)	方法	用以制备的稀释度
$< 1 \times 10^{12}$	qPCR	1:10和1:100
$\geq 1 \times 10^{12}$	qPCR	1:100和1:1000
未知	qPCR	1:10、1:100和1:1000

[0291] 制备DNase主混合物和蛋白酶K主混合物。用DNase处理样品并且与蛋白酶K溶液混合。

[0292] 如表5中详述来制备qPCR主反应混合物:

[0293] 表5:qPCR主反应混合物制备

组分	储备液浓度(μM)	最终浓度(μM)	每个反应的储备液体积(μL)
qPCR 主混合物	NA	NA	10
正向引物	10	0.5	1
反向引物	10	0.5	1
探针	5	0.25	1
模板或样品	可变		5
DIW	NA	NA	2.0
			20 μL (总计)

[0295] 使用以下设置以最大匀变速率操作qPCR:

[0296] 表6:qPCR条件

阶段	温度	时间(mm:ss)	循环
1	95°C	5:00	1
2	95°C	0:15	45
	60°C	1:00	
3	4°C	保持	1

[0298] 如下确定最终拷贝数:

[0299] a. 记录基于测定板中来自所有样品的荧光的靶扩增子的扩增,并且由

QuantStudio™软件自动确定Ct值。

[0300] b.通过对数刻度上绘制每个标准的Ct对比每个反应的拷贝数的图(最终图形是半对数的,其中y轴是线性的并且x轴在log10刻度上)来制定标准曲线。这与直线拟合。

[0301] c.通过用(b)中确定的标准曲线内插Ct值来确定每个反应孔中的载体拷贝数,并且纳入由仪器导出的数据中。

[0302] d.最后,将上述(c)中确定的数量乘以用于制备样品的稀释因子以得到最终拷贝数。如果对样品使用2次或更多次稀释,那么在计算后求取标准曲线中所有有效值的平均值。

[0303] 如果Ct值高于qPCR标准曲线的线性范围,那么可以使用理论上允许响应处于线性范围内的稀释度来重新制备样品。

[0304] 如果满足以下条件,那么测定系统适用性将视为可接受的:

qPCR 参数	接受准则
[0305] 线性度、斜率和截距	- 校准曲线的目标 R^2 (线性度)应 ≥ 0.96 。 - 校准曲线的目标斜率应介于-3.1至-3.6之间,指示qPCR效率为90%至110%。
对照中的扩增	- 空白样品的扩增 Ct 值应 ≥ 35 或“未确定” - DNase 阳性对照样品的 DNase 效率应 $\geq 95\%$ 的线性化质粒标准

[0306] 测试方法鉴定方案

[0307] 目的:本鉴定计划的目的是定义PR001封装AAV产品的物理滴度的测试方法。本方案将证明所述方法产生可靠的数据,并且适于分析用于研究和过程开发目的(非GXP)的纯化AAV样品。上文提供了测试方法。

[0308] 表7:鉴定材料

材料描述	预期浓度
线性化质粒标准	
毒素批次	2.67×10^{11} vg/mL
参考标准	6.25×10^{13} vg/mL
研究病毒库	1.83×10^{13}

[0310] 如上文所描述,用DIW代替DNase来制备准确度和特异性对照。

[0311] 表8:方法鉴定接受准则

	要点	接受准则
[0312]	线性度 - 根据上述测试方法在至少 6 个不同水平上执行线性化质粒标准校准曲线。 将执行至少 6 条不同标准曲线。	- 校准曲线的目标 R^2 (线性度)应 ≥ 0.96 。 校准曲线的目标斜率应介于-3.1 至-3.6 之间, 指示 qPCR 效率为 90%至 110%。
	特异性 - 确保转基因特异性 - 确保去除非封装的 DNA	- 相似或相同载体骨架中不同转基因的 Ct 值 ≥ 35 或“未确定” - DNase 效率 $\geq 95\%$ 的线性化质粒标准
	测定内精密 度 - 以至少 2 次独立稀释来制备参考标准病毒库和研究病毒库(参见上述测试方法), 其中每个样品一式三份操作以允许由两名独立的操作员分析至少 6 次重复(每次执行总共 12 次重复)。	- 每次执行鉴定操作内的平均浓度的 CV% ≤ 15 。
	测定间精密 度 - 进行数天测定内程序, 包括由参考标准病毒库和研究病毒库的两名分析员至少 3 次独立执行。	- 鉴定操作中的平均浓度的 CV% ≤ 15 。
	稀释线性度 和准确度 - 将在至少 3 次单独执行中制备 2 种已知浓度的线性化质粒标准(参见上述测试方法), 其中每个样品一式三份操作。	- 在标称已知质粒浓度内的回收率为 $\pm 25\%$ 。

[0313] 板布局/执行设置

[0314] 表9:qPCR布局(执行1)

	1	2	3	4	5	6	7
[0315]	A	2.00E+07 标准		2e9 质粒 1:1000 + DNase		2e9 质粒 1:100	
	B	2.00E+06 标准		2e9 质粒 1:1000 + DNase		2e9 质粒 1:1,000	
	C	2.00E+05 标准		2e9 质粒 1:1000 + DNase		J00142 (1:30) 1:100	
	D	2.00E+04 标准		水		J00142 (1:30) 1:1,000	
	E	2.00E+03 标准		水		J00171 1:100	
	F	2.00E+02 标准		PR006 1:1000 特异性对照		J00171 1:1,000	
	G	2.00E+01 标准		PR006 1:1000 特异性对照		J00059 1:100	
	H	水		PR006 1:1000 特异性对照		J00059 1:1,000	

[0316] 表10:qPCR布局(执行2和3)

	1	2	3	4	5	6	7
[0317]	A	2.00E+07 标准		2e9 质粒 1:1000 + DNase		2e9 质粒 1:100	
	B	2.00E+06 标准		2e9 质粒 1:1000 + DNase		2e9 质粒 1:1,000	
	C	2.00E+05 标准		2e9 质粒 1:1000 + DNase		J00142 (1:30) 1:100	
	D	2.00E+04 标准		水		J00142 (1:30) 1:1,000	
	E	2.00E+03 标准		水		J00171 1:100	
	F	2.00E+02 标准		水		J00171 1:1,000	
	G	2.00E+01 标准		水		J00059 1:100	
	H	水		水		J00059 1:1,000	

[0318] 数据处理和报告:将由QuantStudio™7获取原始数据,以如上述测试方法中所描述自动计算拷贝/反应。将此数据导出至电子表格中,用于计算额外的测定参数(例如,准确度

和精密度)。将由第二名分析员审查所有结果数据,包括实验细节,诸如材料、试剂、所用设备和测试条件。

[0319] 基于来自所有有效测定操作的结果以及参考标准病毒和研究病毒的所有有效浓度,来自鉴定的所有操作中的总体平均滴度将用于确立这些样品的标称滴度值,以用于进一步测定执行中。

[0320] 实施例12:编码GCCase的rAAV的体外酶促效力测定。

[0321] 本测定的目的是使用基于细胞的测定来测量AAV(例如,AAV9)封装的编码GCCase的载体的体外相对效力。

[0322] 实验室测试方法

[0323] 本方法的目的是使用基于细胞的功能测定来测量AAV封装的编码GCCase的载体的剂量反应。本测试方法可以用于研究目的,诸如比较不同AAV基因治疗产品批次的反应。

[0324] 表11:定义

[0325]	AAV9	腺相关病毒血清型9
	CV	变异系数
	赋形剂	配方缓冲液
	FBS	胎牛血清
	FB	配方缓冲液;与赋形剂相同
	GCCase	葡糖脑苷脂酶,也称为 β -葡糖脑苷脂酶
	Glc	葡萄糖或吡喃葡萄糖苷
	HEK-293T	人胚肾细胞,(含有SV40 T抗原)
	PBS	磷酸盐缓冲溶液
	RT	室温
	SDS	安全数据表
	TS	测试样品,即DS、DP或样品病毒
	VG,vg	病毒基因组,病毒基因组
	RP	相对效力
	RS	参考标准

[0326] 表12:材料和设备

	材料描述	制造商	项目号
[0327]	HEK293T 细胞	来源: Prevail	N/A
	DMEM	Gibco	11-995-065
	FBS (热灭活)	Gibco	1008247
	青霉素(10,000 单位/ml)和链霉素(10,000 μ g/ml)	Gibco	15140122
	TrypLE 选择酶(1X)	Gibco	12563-011
	测定缓冲液: 50 mM 柠檬酸、176 mM K ₂ HPO ₄ 、10 mM 牛磺胆酸钠和 0.01% Tween-20, pH 5.9	来源: Prevail	N/A
	聚-D-赖氨酸 96 孔黑色/透明平底 TC 处理微孔板	Corning	356640
	锥虫蓝染色剂	Invitrogen	T10282
[0328]	Hoechst 33342 染色剂(16.234mM)	Molecular probes	H3570
	待测试的 AAV	来源: Prevail	N/A
	赋形剂	匹配 AAV	N/A
	稀释板: 96 孔 PCR 微孔板	Axygen	PCR-96-FS-C
	蛋白酶抑制剂, 无 EDTA	Pierce	A32955 或 A32965
	96 孔黑色透明平底板	Corning	3904
	Varioskan Lux Reader	Thermo Fisher Scientific	FA-0049
	Biopur Safe Lock 1.5mL 无菌微量离心管	Fisher Scientific	21-402-903
	血细胞计数器; INCYTO; 一次性; C 芯片	Incyte	22600100
	25mL 无菌一次性储罐	Fisher Scientific	21-381-27C
	试卤灵-b-D-吡喃葡萄糖苷	Marker Technologies	GeneM0569
	二甲亚砜(DMSO)	Sigma-Aldrich	D2438-50ML

[0329] 背景/方法理论: PR001 是表达 GBA1 的示例性 rAAV。转导测定将 PR001 引入 HEK293T 细胞中并引起 GCase 酶表达。使用荧光底物 4-甲基伞形酮- β -D-吡喃葡萄糖苷在细胞溶解产物中测定来源于转导的酶活性, 所述底物通过 GCase 催化产生荧光产物试卤灵。使用平行线分析, 由不同 PR001 量的转导产生的酶促活性计算两种或多种 rAAV 之间的相对效力。

[0330] 表 13: 试剂/稀释剂/培养基

[0331]	项目
	10% FBS/DMEM/Pen/Strep [细胞培养基]
	2% FBS/DMEM
	10% FBS/DMEM/ 1 μ M Hoechst 33342 [回收培养基]
	50mM 柠檬酸盐 - 176mM 磷酸盐测定缓冲液, pH 5.9
	含 2 μ M Hoechst 33342 的 2% FBS/DMEM [转导培养基]
	含蛋白酶抑制剂混合物微型片剂的测定溶解缓冲液
试卤灵- β -D-吡喃葡萄糖苷[储备液]	

[0332] 程序:将HEK293T细胞以20,000个细胞/孔铺于96孔板中,并且在37 $^{\circ}$ C和5% CO₂下贴壁过夜。如表14中所示,在其赋形剂中制备AAV的系列稀释液。

[0333] 表14

稀释	vg/ μ L	病毒体积 (μ L)	来源(稀释)	赋形剂体积(μ L)	剩余体积(μ L)
1	5.00E+09	60	N/A	N/A	20
2	3.33E+09	40	1	20	20
3	2.22E+09	40	2	20	20
4	1.48E+09	40	3	20	20
5	9.88E+08	40	4	20	20
6	6.58E+08	40	5	20	20

[0335] 将10 μ L AAV稀释液或媒介剂转移至遵循图1中的板图的孔中。获得所得的总vg(表15)。

[0336] 表15

vg/ μ L	添加的 μ L	总vg/孔
5.00E+09	10	5.00E+10
3.33E+09	10	3.33E+10
2.22E+09	10	2.22E+10
1.48E+09	10	1.48E+10
9.88E+08	10	9.88E+09
6.58E+08	10	6.58E+09

[0338] 在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂孵育器中孵育细胞2至2.5小时。孵育后,将100 μ L回收培养基于细胞/转导培养基中添加至孔中,达到150 μ L总体积。在37 $^{\circ}$ C和5% CO₂下孵育细胞72+6小时,以允许源自病毒的GCase表达。

[0339] 收获细胞溶解产物。通过将10 μ L的1.25mM试卤灵- β -D吡喃葡萄糖苷工作溶液添加至黑色透明平底板中,继而添加40 μ L细胞溶解产物来测量GCase活性。在37 $^{\circ}$ C下立即在Varioskan读板器上读取板。

[0340] 分析:如下进行数据的平行分析以计算相对效力:

[0341] 1. 计算每个vg/孔点的CV%，其应≤30%。如有必要，每个vg/孔点可以弃去至多一次重复以达成此目的。

[0342] 2. 对病毒量和GCase活性 (RFU/h) 进行对数转换。

[0343] 3. 将响应绘制为Log (RFU/h) 对比Log (病毒)。

[0344] 4. 对每个样品进行线性回归。

[0345] 5. 进行具有共同斜率“A” ($Y=A X+b$) 的新线性回归。

[0346] 6. 使用步骤5中获得的参数，使用以下公式计算相对效力：

[0347] 相对效力 (%) = $10^{((b-b_{\text{参考}})/A) \times 100}$

[0348] 7. 以百分比形式报告相对于参考标准的结果，无小数 (例如，如果结果是100.50，那么将为101%)。

[0349] 表16:测定系统适用性和样品准则

参数	接受准则
斜率与平均斜率的比率	分析步骤 3 的斜率与共同斜率(分析步骤 4)的比率应介于0.60-1.40 之间
[0350] R^2	RS 的分析步骤 3 中线性回归的目标 R^2 应> 0.9
参考标准和测试样品重复	CV% ≤ 30。可以屏蔽一次重复以达成 CV% ≤ 30。

[0351] 测试方法鉴定方案

[0352] 目的:本鉴定计划的目的是定义使用基于细胞的测定来测量体外PR001的相对效力的测试方法。本方案将证明所述方法产生可靠的数据，并且适于分析用于研究和过程开发目的 (非GXP) 的AAV样品。

[0353] 表17:鉴定材料

材料描述	物理滴度
PR001参考标准	2.62E+13vg/mL
特异性对照 (PR006产品)	1.64E+13vg/mL

[0355] 鉴定计划:将根据分析测试方法的验证进行验证，这是国际协调会议 (ICH) Q2 (R1)、USP<1032>和USP<1033>中描述的程序。验证测试将由以50%、100%和200%的相对效力水平以及特异性测试AAV9-GBA DP组成。为了评价方法的线性度、准确度和精密度 (可重复性和中间精密度)，将由两名分析员测试每个水平。每个测定的相对效力是独立的并且视为单一测定的确定值。每个板将含有一个参考标准和至多两个测试样品。如果系统适用性在板上不合格，则将重复所述板。如果系统适用性对于样品不合格，则将仅重复不合格的样品。所有样品都应符合方法中定义的测定接受准则和本方案中定义的验证准则。还将使用不携带GBA1的无关AAV产品进行特异性的确定。未包括检测限和定量限，因为它们与USP<1032>中解释的报告相对效力的方法无关。表18汇总了将用于评估方法性能的验证程序和接受准则。

[0356] 表18:验证程序和鉴定接受准则的汇总

[0357]

参数	定义	程序和数据分析	接受准则
线性度	所述方法获得与样品中分析物的浓度(量)成正比的测试结果的能力(在给定范围内)。	将 AAV9-GBA 测试样品稀释至参考标准的 50%、100%和 200%，并且每个浓度将测试至多 4 次。将平均(测量的)相对效力对比预期相对效力绘图并且使用线性回归进行分析。	线性回归的确定系数(R^2)将 ≥ 0.9 。
准确度	公认为样品真实值的值与从测量获得的值之间的一致性接近程度。	将评价线性数据以评估准确度。将计算每个水平的平均回收%。	每个水平的平均回收%将介于理论值的 50%与 150%之间。
可重复性	在相同操作条件下短时间间隔内测量的精密度(即，在指定条件下对同一均质样品进行多次取样所获得的一系列测量值之间的一致性接近程度)。	将评价线性数据以评估可重复性。将在每个测定的每个水平上(即，同一分析员和同一周)计算相对标准偏差百分比(RSD%)。	每名分析员每周每个水平的 RSD%将 $\leq 30\%$ 。
中等精密度	表达不同周和不同分析员的变异的精密度(即，在指定条件下对同一均质样品进行多次取样所获得的一系列测量值之间的一致性接近程度)。	将评价线性数据以评估中间精密度。将计算每个水平的总体 RSD%。	每个水平的总体 RSD%将 $\leq 30\%$ 。

[0358]

范围	证明适合的线性度、准确度和精密度水平的在高浓度与低浓度之间的间隔。	线性度、准确度和精密度的结果将用于确定方法范围。	将在研究中确定所述范围。范围内的样品浓度必须满足线性度、准确度和精密度的接受准则。
特异性	在可能预期存在的组分存在下明确评估分析物的能力。	将由一名分析员在一次测定中测试替代分子。	替代分子将不符合样品接受准则。

[0359] **线性度**:将AAV9-GBA测试样品稀释至参考标准的50%、100%和200%，并且将由两名分析员在七次测定中测试。将平均(测量的)相对效力对比预期相对效力绘图并且使用线性回归进行分析。将报告生成的线性方程和确定系数(R^2)。系统适用性不合格的测定板不得用于分析。

[0360] **准确度**:将评价线性数据以评估准确度。将使用以下公式计算每个水平的平均回收%:

[0361]
$$\text{回收}\% = \left(\frac{\text{平均测量值}}{\text{理论值}} \right) \times 100\%$$

[0362] 将报告每个水平的回收%值。

[0363] 可重复性:将评价线性数据以评估可重复性。将在每个测定的每个水平上(即,同一分析员和同一周)计算相对标准偏差百分比(RSD%)并报告。

[0364] 中间精密度:将评价线性数据以评估可重复性。将计算每个水平的总体RSD%并报告。

[0365] 范围:所测试的符合线性度、准确度和精密度实验准则的最低和最高效力将用于确定方法范围并将报告。

[0366] 特异性:将由一名分析员在一次测定中测试替代分子(特异性样品)。将特异性样品稀释至测定中,如同它们是AAV9-GBA测试样品一样。特异性样品是替代分子(AM):PR006。

[0367] 数据处理和报告:将由SkanIt RE 5.0软件获取原始数据,并且如上述测试方法中所指示进行平行线分析。将此数据导出至电子表格中,用于计算额外的测定参数(例如,准确度和精密度)。将由第二名分析员记录和审查所有结果数据,包括实验细节,诸如材料、试剂、所用设备和测试条件。

[0368] 基于来自所有有效测定操作的结果以及参考标准病毒和研究病毒的所有有效浓度,来自鉴定的所有操作中的总体平均相对效力将用于确立这些样品的标称RP值,以用于进一步测定执行中。

[0369] 来自几个PR001样品的效力测定数据的实例示于图2中。

[0370] 实施例13:测量编码颗粒蛋白前体的rAAV的滴度的定量PCR测定。

[0371] 本测定的目的是使用定量PCR(qPCR)通过与已知标准进行比较或在不存在标准的情况下通过ddPCR来定量编码PGRN的AAV(例如,AAV9)封装载体的物理滴度。本测试方法可以用于定量纯化的AAV病毒样品或过程产生级分中的物理载体基因组滴度。

[0372] 实验室测试方法

[0373] 表19:材料

	材料描述	制造商	项目号
	PerfeCTa qPCR 与 ROX 的超混物	QuantaBio	95051-500
	用于探针的 ddPCR 超混物(无 dUTP)	BioRad	1863027
	超纯蒸馏水(DIW)	Invitrogen	10977-023 或等效物
[0374]	MicroAmp 光学 96 孔反应	Applied Biosystems	43-067-37
	MicroAmp 光学胶膜	Applied Biosystems	43-119-71
	箔热封	BioRad	1814040
	用于自动液滴产生器的移液器吸头	BioRad	1864120

	DG32 自动液滴产生器筒	BioRad	1864108
	ddPCR 96 孔板(半裙边)	BioRad	12001925
	用于探针的自动液滴产生油	BioRad	1864110
	OctaPool™储液罐, 25ml 一次性, 无菌	Thomas Scientific	1159X93 或等效物
	DNA Away	Fisher Scientific	M0303L 或等效物
	PCR 8 孔管条和管盖	VWR	2017-004
[0375]	Eppendorf DNA LoBind 微量离心管 1.5ml	Eppendorf	022431021
	Tween-80 (聚山梨醇酯 80)	VWR	JT4117-02
	蛋白酶 K, 20mg/mL	Promega	MC5005
	20% SDS 溶液	Fisher Scientific	BP1311-1 或等效物
	0.5M EDTA pH 8.0	Fisher Scientific	BP2482 或等效物
	TE 缓冲液, pH 8.0	Fisher Scientific	AM9849 或等效物
	Falcon 锥形管 15ml	Fisher Scientific	14 959 53A 或等效物
	Falcon 锥形管 50ml	Fisher Scientific	14 432 22 或等效物
	DNase I (无 RNase)	New England BioLabs	M0303S
	Lambda Hind III 消化 DNA	New England BioLabs	B7025

[0376] 表20: 设备

	设备描述	制造商	项目号
	QuantStudio™ 7 Flex	Applied Biosystems	4485695
	移液组 LTS Pipet-Lite XLS+手册 (P2,P20,P200,P1000)	Rainin	30386597
	组合 PCR 工作站	AirClean™ Systems	AC632LFUVC
	Sorvall ST8R 离心机	Fisher Scientific	75 230 395
[0377]	Myspin 6 微型离心机	Fisher Scientific	75 004 061 或等效物
	微型涡旋混合器	Fisher Scientific	400815B 或等效物
	Simpliamp PCR 热循环仪	Thermo Fisher	A24811 或等效物
	PX1 封板机	BioRad	181-4000
	自动液体产生器	BioRad	1864101
	QX200 液滴读取器	BioRad	1864001 和 1864003
	C1000 Touch 热循环仪	BioRad	10000068706

[0378] 将线性化质粒PR006A用PmlI线性化。病毒参考标准是不同批次的PR006。

[0379] 表21: 引物

	引物或探针	名称	序列
	正向引物	PR006-1_F	GTCTTCCACGACTGTGGGAT (SEQ ID NO: 9)
[0380]	反向引物	PR006-1_R	GTCAGGGCCACCCAGCTC (SEQ ID NO: 10)
	TaqMan 探针	PR006-1_探针	6FAM-CCGGTTGAGCCACCATGTGGACCC (SEQ ID NO: 11) -TAMRA

[0381] 注意: 假定所有引物均由供应商以100μM提供, 并且具有HPLC级纯度或更高纯度。

[0382] 背景/方法理论: 为了确定封装靶序列的AAV拷贝量, 使用利用一种或两种方法的

PCR扩增所需序列。第一种方法使用实时qPCR,其中使用荧光报告分子(诸如染料标记的探针)来监测扩增反应的进程。在每个扩增循环中,荧光强度的增加与扩增子浓度的增加成比例,其中qPCR仪器系统在每个PCR循环期间收集每个样品的数据。然后将所有样品的荧光对比循环数的结果图与它们的背景荧光一起设置在共同的起点。扩增曲线超过预定背景阈值荧光水平时的循环数称为“Ct”或阈值循环。通过将未知物的Ct值与以各种浓度稀释的已知标准进行比较,确定未知样品的起始浓度,从而在给定样品中产生所需拷贝量(如果存在的话)。第二种方法使用ddPCR,它将样品离散化为单独的液滴。然后通过PCR扩增液滴,并且在液滴读取器中将液滴计数为阳性(含荧光)或阴性(无荧光)。然后使用泊松统计(Poissonian statistics)从阳性液滴与总液滴的比率直接确定绝对拷贝数,并且因此不需要标准。

[0383] 程序:

[0384] 制备10%聚山梨醇酯80、PCR稀释缓冲液、10X蛋白酶K缓冲液和标准稀释剂。如有需要,将线性化质粒稀释至 2×10^9 个拷贝/ μL 。使用第一标准在标准稀释剂中进行10倍连续稀释,以制定范围为 2×10^7 个拷贝/ μL 至20个拷贝/ μL 的标准曲线。将一组标准(2×10^7 至20个拷贝/ μL)等分至8孔0.2mL PCR管条的7个孔中,使得每个管条用作一次性标准曲线。由冻干的引物制备引物储备液。

[0385] 制备空白和DNase对照。制备参考标准和样品。所有样品和参考标准都一式三份操作。基于表22的初始浓度选择所有样品类型的样品稀释度。

[0386] 表22:样品和参考标准稀释程序

[0387]

理论样品浓度(拷贝/mL)	方法	用以制备的稀释度
$< 1 \times 10^{12}$	qPCR	1:10和1:100
$< 1 \times 10^{12}$	ddPCR	1:100和1:1000
$\geq 1 \times 10^{12}$	qPCR	1:100和1:1000
$\geq 1 \times 10^{12}$	ddPCR	1:1000和1:10000
未知	qPCR	1:10、1:100和1:1000
未知	ddPCR	1:100、1:1000和1:10000

[0388] 如表23中详述来制备qPCR主混合物:

[0389] 表23:qPCR主反应混合物制备

[0390]

组分	储备液浓度(μM)	最终浓度(μM)	每个反应的储备液体积(μL)
qPCR 主混合物	NA	NA	10
正向引物	10	0.5	1
反向引物	10	0.5	1
探针	5	0.25	1
模板或样品	可变		5
DIW	NA	NA	2.0
			20μL (总计)

[0391] 对于ddPCR,使用以下反应混合物,类似于表23制备:

[0392] 表24:ddPCR主反应混合物制备

组分	储备液浓度(μM)	最终浓度(μM)	每个反应的储备液体积(μL)
ddPCR 主混合物	NA	NA	11
正向引物	10	0.5	1.1
[0393] 反向引物	10	0.5	1.1
探针	5	0.25	1.1
模板或样品	可变		2.5
DIW	NA	NA	5.2
			22μL (总计)

[0394] 如下操作qPCR或ddPCR。对于qPCR,将15 μL 主反应混合物添加至将含有样品的测定板的所有孔中。对于ddPCR,将19.5 μL 主反应混合物添加至将含有样品的测定板的所有孔中。将先前等分的标准以每孔5 μl 添加至板中用于qPCR。对于ddPCR,可以跳过此步骤,因为不使用标准曲线。将5 μL 用于qPCR的稀释样品、对照或参考标准、2.5 μL 用于ddPCR的稀释样品添加至各自的板中。每个测定中还应包括无模板对照,其中用水代替样品。

[0395] 使用以下设置以最大匀变速率操作qPCR:

[0396] 表25:qPCR条件

阶段	温度	时间(mm:ss)	循环
1	95 $^{\circ}\text{C}$	5:00	1
[0397] 2	95 $^{\circ}\text{C}$	0:15	45
	60 $^{\circ}\text{C}$	1:00	
3	4 $^{\circ}\text{C}$	保持	1

[0398] 如下确定最终拷贝数:

[0399] a. 记录基于测定板中来自所有样品的荧光的靶扩增子的扩增,并且由QuantStudioTM软件自动确定Ct值。

[0400] b. 通过在对数刻度上绘制每个标准的Ct对比每个反应的拷贝数的图(最终图形是半对数的,其中y轴是线性的并且x轴在log₁₀刻度上)来制定标准曲线。这与直线拟合。

[0401] c. 通过用(b)中确定的标准曲线内插Ct值来确定每个反应孔中的载体拷贝数,并且纳入由仪器导出的数据中。

[0402] d. 最后,将上述(c)中确定的数量乘以用于制备样品的稀释因子以得到最终拷贝数。如果对样品使用2次或更多次稀释,那么在计算后求取标准曲线中所有有效值的平均值。

[0403] 如下操作ddPCR:

[0404] 表26:ddPCR条件

阶段	温度	时间(mm:ss)	循环
1	95°C	10:00	1
2	94°C	0:30	39
	60°C	1:00	
3	98°C	10:00	1
4	12°C	保持	1

[0405] 由QuantSoft软件基于相对于总滴数的阳性滴数使用泊松统计自动确定最终拷贝数。如果对样品使用2次或更多次稀释,那么将在计算后求取标准曲线中所有有效值的平均值。将这些计数纳入数据导出中。如果Ct值高于qPCR标准曲线的线性范围或在ddPCR中确定为“无读出”,那么将使用理论上允许响应处于线性范围内的稀释度来重新制备样品。

[0406] 如果满足以下条件,那么测定系统适用性将视为可接受的:

qPCR 参数	接受准则
线性度、斜率和截距	校准曲线的目标 R^2 (线性度)应 ≥ 0.96 。校准曲线的目标斜率应介于-3.1至-3.6之间,指示qPCR效率为90%至110%。校准曲线的目标截距应介于Ct值36与41之间。
阴性对照中的扩增	所有空白和DNase阳性对照都应具有扩增Ct值 ≥ 35 或“未确定”
准确度	在有效范围内的平均浓度的参考标准计算拷贝是预期浓度 $\pm 20\%$

ddPCR 参数	接受准则
阴性对照中的扩增	所有空白和DNase阳性对照都应具有小于5个拷贝/ μL 的浓度
准确度	参考标准计算拷贝是预期浓度 $\pm 20\%$

[0407] 如果满足以下条件,那么样品适用性将视为可接受的:

ddPCR参数	接受准则
液滴计数	公认的液滴总数必须 > 10000 。

[0408] 测试方法鉴定方案

[0409] 目的:本鉴定计划的目的是定义PR006封装AAV产品的物理滴度的测试方法。本方案将证明所述方法产生可靠的数据,并且适于分析用于研究和过程开发目的(非GXP)的纯化AAV样品。上文提供了测试方法。

[0410] 表27:鉴定材料

材料描述
PR006线性化质粒标准
PR006参考标准病毒库
PR006研究病毒库
特异性对照 (PR001产品)

[0416] 如上文所描述,用DIW代替DNase来制备准确度和特异性对照。

[0417] 表28:方法鉴定接受准则

	要点	接受准则
线性度	- 根据上述测试方法在至少 6 个不同水平上执行线性化质粒标准校准曲线。 将执行至少 6 条不同标准曲线。	- 校准曲线的目标 R^2 (线性度)应 ≥ 0.96 。校准曲线的目标斜率应介于-3.1至-3.6 之间,指示 qPCR 效率为 90%至 110%。
特异性	- 确保转基因特异性 - 确保去除非封装的 DNA	- 相似或相同载体骨架中不同转基因的 Ct 值 ≥ 35 或“未确定” - DNase 效率 $\geq 95\%$ 的线性化质粒标准
测定内精密度	- 以至少 2 次独立稀释来制备参考标准病毒库和研究病毒库(参见上述测试方法),其中每个样品一式三份操作以允许由两名独立的操作员分析至少 6 次重复(每次执行总共 12 次重复)。	- 将结果报告为每次执行鉴定操作内的平均浓度的 CV%。
测定间精密度	- 进行数天测定内程序,包括由参考标准病毒库和研究病毒库的两名分析员至少 3 次独立执行。	- 将结果报告为鉴定操作中的平均浓度的 CV%。
稀释线性度和准确度	- 将在至少 3 次单独执行中制备 3 种已知浓度的线性化质粒标准(参见上述测试方法),其中每个样品一式三份操作以允许由两名独立的操作员分析至少 27 次重复,总计 54 次重复。	- 将结果报告为标称已知质粒浓度的 CV%。

[0419] 板布局/执行设置

[0420] 表29:qPCR布局(执行1)

	1	2	3	4	5	6	7
A	2.00E+07 标准		2e9 质粒 1:1000 + DNase		2e9 质粒 1:10		
B	2.00E+06 标准		2e9 质粒 1:1000 + DNase		2e9 质粒 1:100		
C	2.00E+05 标准		2e9 质粒 1:1000 + DNase		2e9 质粒 1:1000		
D	2.00E+04 标准		水		研究病毒 1:100		
E	2.00E+03 标准		水		研究病毒 1:1000		
F	2.00E+02 标准		PR001 1:1000 特异性对照		研究病毒 1:10000		
G	2.00E+01 标准		PR001 1:1000 特异性对照		参考标准 1:100		
H	水		PR001 1:1000 特异性对照		参考标准 1:1000		

[0422] 表30:qPCR布局(执行2和3)

	1	2	3	4	5	6	7
A	2.00E+07 标准			2e9 质粒 1:1000 + DNase	2e9 质粒 1:10		
B	2.00E+06 标准			2e9 质粒 1:1000 + DNase	2e9 质粒 1:100		
C	2.00E+05 标准			2e9 质粒 1:1000 + DNase	2e9 质粒 1:1000		
[0423] D	2.00E+04 标准			水	研究批次 1:100		
E	2.00E+03 标准			水	研究批次 1:1000		
F	2.00E+02 标准			水	研究批次 1:10000		
G	2.00E+01 标准			水	参考标准 1:100		
H	水			水	参考标准 1:1000		

[0424] 数据处理和报告

[0425] 将由QuantStudio™7获取原始数据,以如上述测试方法中所描述自动计算拷贝/反应。将此数据导出至excel工作表中,用于计算额外的测定参数(例如,准确度和精密密度)。将由第二名分析员记录和审查所有结果数据,包括实验细节,诸如材料、试剂、所用设备和测试条件。

[0426] 基于来自所有有效测定操作的结果以及参考标准病毒和研究病毒的所有有效浓度,将使用来自鉴定的所有操作中的总体平均滴度。

[0427] 实施例14:编码颗粒蛋白前体的rAAV的体外酶促效力测定。

[0428] 本测定测量了编码PGRN的rAAV(例如,AAV9)的体外效力。以96孔格式进行所述测定。将HEK293细胞以20,000个细胞/孔铺板,并且第二天用不同药物浓度的AAV9-GRN转导用于测试物品和参考标准。转导后72小时,通过ELISA(AdipoGen Life Sciences目录号AG-45A-0018YEK-KI01)测量PGRN水平。使用平行线分析计算相对于参考标准的相对效力的报告值。来自几个PR006(包含AAV9衣壳并编码PGRN的rAAV)样品的效力测定数据的实例示于图3中。或者,可以使用6个MOI组降低斜率比的可变性。也可以改变稀释因子以覆盖样品的颗粒蛋白前体水平范围,从而最大限度地减少重复次数。

[0429] 实施例15:用于测量rAAV组合物的蛋白质纯度和病毒衣壳蛋白比率的测定

[0430] 目的:本方法的目的是通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)估计rAAV样品的蛋白质纯度和病毒蛋白比率。

[0431] 范围和背景:本测试方法可以用于以半定量方式估计纯化的rAAV病毒样品或过程产生级分的纯度或条带比。

[0432] SDS-PAGE基于相对分子量在还原和变性条件下解析蛋白质混合物的组分,以评估样品的均质性。**SYPRO**® Ruby蛋白质凝胶染色剂是检测通过PAGE分离的蛋白质的超灵敏发光染色剂。本测定的目的是确定AAV衣壳蛋白(VP 1、2和3)和其它杂质条带的相对数量。所述方法可以用于计算VP条带的比率和/或这些条带相对于所有杂质条带的纯度百分比。可以相对于分子量阶梯标准确定样品中所有蛋白质的分子量。

[0433] 程序:制备固定缓冲液、洗涤缓冲液、MES操作缓冲液和样品缓冲液混合物。制备rAAV样品连续稀释液。样品可以一式三份操作。将样品和分子量阶梯标准加载至凝胶中,并且操作凝胶。然后用**SYPRO**® Ruby染色剂对凝胶进行染色。然后分析染色凝胶的图像(ChemiDoc™MP成像系统,BioRad)以计算样品的VP条带比率和纯度。VP1、VP2和VP3的预期分子量如下:VP1=87kDa,VP2=72kDa,VP3=62kDa。

[0434] 如果满足以下条件,那么测定系统适用性将视为可接受的:

凝胶参数	接受准则
[0435] 动态检测范围内的样品	如果选择“高亮饱和像素”设置时,给定样品的任何 VP 条带超过 20%以红色高亮显示。其它样品可以保持有效,但必须重复不符合此要求的特定样品。
有效迁移凝胶	凝胶上的流动前沿或染料应位于凝胶的底部

[0436] 两批PR006 (AAV9-PGRN) 材料展现出体外效力的差异。为了研究这种差异,进行如上文所描述的SDS-PAGE以确定这些批次中的杂质水平和VP衣壳蛋白比率是否显著不同。还进行了分析型超速离心以研究这些批次中全颗粒与部分颗粒的比率。

[0437] 本研究的范围是比较两个rAAV批次的产品纯度和全颗粒:空衣壳颗粒,这是可能影响产品效力的产品属性。这将通过两种方法进行评估:第一种方法将通过SDS-PAGE分析病毒蛋白比率和相对于病毒蛋白的杂质量。第二种方法利用分析型超速离心(AUC)来分离和定量全颗粒与部分颗粒的比率。将在同一凝胶上对两个批次进行SDS-PAGE,以允许与储存在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 的测试材料进行相对比较。

[0438] 样品处置:在测试之前,将等分并登记单个小瓶的G14C0519。将一个100 μL 等分试样储存于 $< -60^{\circ}\text{C}$ 下,用于如下文所详述的SV-AUC的单次操作。将单独的50 μL 等分试样储存于 $< -60^{\circ}\text{C}$ 下,直至通过如上文所详述的SDS-PAGE进行分析。

[0439] 测试程序:将如上文所描述分析这些样品的SDS-PAGE。除了基于每个批次的CoA上报告的总vg加载样品外,还将使用微量BCA在每个批次的CoA上报告的蛋白质浓度通过基于总蛋白质加载等量来测试样品。

[0440] 将进行分析型超速离心。简单地说,最初用样品缓冲液将样品稀释至230nm处0.5的OD并且作为单次重复进行操作。使用以下参数操作样品:

[0441] 表33

过程步骤	参数	设置
XLI 数据收集	转子速度	12000 rpm
	扫描速度	90 秒/细胞
	扫描	150-200
	温度	20 $^{\circ}\text{C}$
	波长	230nm
SEDFIT 分析	S 范围(最小-最大)	0-200 (或如评价)
	底部(cm)	7.15
	弯月面(cm)	浮动
	f/f0	浮动
	置信区间	0.68/0.95
	Vbar (mL/g) ³	0.73
	ρ (g/mL)	1.000
	η (cP)	0.01002
	RI 噪声	浮动
TI 噪声	浮动	

[0443] 根据生成的SEDFIT c(s)配置文件并且为了评价峰值是否可重现或模型拟合可能

导致的建模伪影(“假”峰),实施了可重现的阈值准则。可重现的阈值定义为衣壳种类<0.5%和/或<0.0020D的吸光度百分比,低于此准则的种类不包括在列表结果中。分析的全部细节将包括在生物分析报告中。将报告通过此分析确定的全颗粒与部分颗粒的所得比率(基于适合c(s)分布的总数的百分比)。

[0444] **数据分析和数据报告:**将记录和登记所有数据。对于SDS-PAGE结果,将比较各批次之间VP1衣壳蛋白的组成%。基于文献(参见Bosma等(2018)Gene Therapy 25:415-424和其中的参考文献),VP蛋白质的这种比率是控制产品效力的关键因素。对于AUC方法,相对于空衣壳和部分包装的衣壳更高的全颗粒%将与增加的效力相关。

[0445] 编号的实施方案

[0446] 尽管有随附权利要求书,但本公开阐述以下编号的实施方案:

[0447] 1.一种用于产生细胞溶解产物的方法,所述方法包括:

[0448] (i)获得含有悬浮于包含两种或更多种无血清和/或无蛋白质昆虫细胞培养基的混合物中的昆虫细胞的生物反应器;

[0449] (ii)用第一杆状病毒载体群体以介于约1.0与2.0之间的感染复数(MOI)感染所述昆虫细胞,其中所述第一杆状病毒载体群体包含编码所关注的基因产物的表达盒;

[0450] (iii)用一个或多个额外杆状病毒载体群体以介于约1.0与2.0之间的MOI感染所述昆虫细胞,其中所述额外群体各自包含编码AAV Rep蛋白和/或AAV Cap蛋白的表达盒;

[0451] (iv)在所述受感染的昆虫细胞产生编码所关注的所述基因的重组腺相关病毒(rAAV)颗粒的条件下培养所述受感染的昆虫细胞;以及

[0452] (v)使所述受感染的昆虫细胞溶解以产生包含所述rAAV颗粒的细胞溶解产物。

[0453] 2.如实施方案1所述的方法,其中所述两种或更多种无血清和/或无蛋白质昆虫培养基中的每一者选自4Cell Insect CD培养基、ESF-921、ESF-AF、ExpiSf CD培养基、Express Five SFM、baculoGROW、IS SF和SF900 II SFM。

[0454] 3.如实施方案1或2所述的方法,其中所述混合物包含约10%v/v至约50%v/v的SF900 II SFM培养基。

[0455] 4.如实施方案1至3中任一项所述的方法,其中在原株扩种4-6代后获得(i)的所述昆虫细胞。

[0456] 5.如实施方案1至4中任一项所述的方法,其中(ii)的所述感染和(iii)的所述感染同时发生。

[0457] 6.如实施方案1至5中任一项所述的方法,其中所述昆虫细胞以介于 $8E+06$ 个活细胞/毫升(vc/mL)至约 $20E+06$ vc/mL之间的细胞密度存在于所述生物反应器中。

[0458] 7.如实施方案1至6中任一项所述的方法,其中(iv)的所述培养在1天与5天之间持续发生。

[0459] 8.如实施方案1至7中任一项所述的方法,其中(v)的所述溶解包括使所述受感染的昆虫细胞与去垢剂接触。

[0460] 9.如实施方案1至8中任一项所述的方法,所述方法还包括通过深度过滤使所述细胞溶解产物澄清的步骤。

[0461] 10.如实施方案1至9中任一项所述的方法,所述方法还包括通过切向流过滤和/或透滤来浓缩所述溶解产物中的所述rAAV颗粒的步骤。

- [0462] 11. 如实施方案1至10中任一项所述的方法,其中所关注的所述基因产物包括肽、多肽、抑制性核酸或它们的组合。
- [0463] 12. 如实施方案11所述的方法,其中所关注的所述基因产物包括葡糖脑苷脂酶(GCase)、颗粒蛋白前体(PGRN)、鞘脂激活蛋白原(PSAP)、C9orf72、在髓样细胞上表达的触发受体2(TREM2)、载脂蛋白E2(ApoE2)或帕金森蛋白。
- [0464] 13. 如实施方案1至12中任一项所述的方法,其中所述rAAV颗粒包含AAV衣壳蛋白,所述AAV衣壳蛋白是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9或前述任一者的变体。
- [0465] 14. 如实施方案1至13中任一项所述的方法,其中所述细胞溶解产物包含
- [0466] (a) 约 $1\text{E}+11$ 个病毒基因组/毫升(vg/mL)至约 $1.0\text{E}+13$ vg/mL;
- [0467] (b) 约 $2\text{E}+11$ 个病毒基因组/毫升(vg/mL)至约 $1.0\text{E}+13$ vg/mL;或
- [0468] (c) 约 $5\text{E}+11$ 个病毒基因组/毫升(vg/mL)至约 $1.0\text{E}+13$ vg/mL。
- [0469] 15. 一种药物组合物,所述药物组合物包含通过如实施方案1至14中任一项所述的方法产生的细胞溶解产物。
- [0470] 16. 如实施方案15所述的组合物,所述组合物还包含冷冻保护剂。
- [0471] 17. 一种用于产生治疗性组合物的方法,所述方法包括:
- [0472] (i) 获得包含rAAV颗粒的细胞溶解产物;
- [0473] (ii) 使亲和色谱柱与所述细胞溶解产物接触,其中所述亲和柱包含在所述rAAV颗粒结合至所述亲和色谱柱的条件下对所述rAAV颗粒的衣壳蛋白具有特异性的结合剂;
- [0474] (iii) 从所述柱上洗脱所述结合的rAAV颗粒,从而产生第一洗脱液;
- [0475] (iv) 对所述第一洗脱液进行阴离子交换色谱以产生第二洗脱液,其中所述第二洗脱液包含比所述第一洗脱液更少的空rAAV颗粒;
- [0476] (v) 通过使用包含Tris、MgCl₂、NaCl和泊洛沙姆188的流动缓冲液进行切向流过滤来浓缩所述第二洗脱液,从而产生包含rAAV颗粒的治疗性组合物。
- [0477] 18. 如实施方案17所述的方法,其中(i)的所述细胞溶解产物通过如实施方案1至14中任一项所述的方法获得。
- [0478] 19. 如实施方案17或18所述的方法,其中所述结合剂包含对AAV9衣壳蛋白具有特异性的亲和树脂。
- [0479] 20. 如实施方案17至19中任一项所述的方法,其中所述阴离子交换色谱包括将所述第一洗脱液与平衡缓冲液混合以产生具有介于约 0.5mS/cm 至 5mS/cm 之间的电导率的混合物,任选地其中所述混合物具有 2mS/cm 的电导率,使所述混合物结合至含季胺的树脂以使所述混合物中的所述rAAV颗粒结合至所述树脂,以及从所述树脂上洗脱所述rAAV颗粒以产生所述第二洗脱液。
- [0480] 21. 如实施方案17至20中任一项所述的方法,其中将所述第二洗脱液从约 $1.0\text{E}+12$ vg/mL浓缩至约 $1\text{E}+14$ vg/mL。
- [0481] 22. 如实施方案17至21中任一项所述的方法,其中所述治疗性组合物包含约 $1\text{E}+13$ vg/mL至约 $1\text{E}+14$ vg/mL。
- [0482] 23. 如实施方案17至22中任一项所述的方法,其中所述治疗性组合物包含小于约15%的空rAAV颗粒。

- [0483] 24. 一种包含rAAV颗粒的治疗性组合物,其中所述rAAV颗粒包含AAV衣壳蛋白和编码所关注的基因产物的表达盒,其中所述治疗性组合物包含大于约 $1E+13$ vg/mL的rAAV颗粒,并且其中所述治疗性组合物包含小于约15%的空rAAV颗粒。
- [0484] 25. 如实施方案24所述的治疗性组合物,其中所关注的所述基因产物包括肽、多肽、抑制性核酸或它们的组合。
- [0485] 26. 如实施方案25所述的治疗性组合物,其中所关注的所述基因产物包括GCase、GRN、PSAP、TREM2、ApoE2或帕金森蛋白。
- [0486] 27. 如实施方案24-26中任一项所述的治疗性组合物,其中所述rAAV颗粒包含AAV衣壳蛋白,所述AAV衣壳蛋白是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9或前述任一者的变体。
- [0487] 28. 如实施方案24-27中任一项所述的治疗性组合物,其中所述治疗性组合物包含约 $1E+13$ vg/mL至约 $1E+14$ vg/mL。
- [0488] 29. 如实施方案24-28中任一项所述的治疗性组合物,其中所述治疗性组合物是在容器中。
- [0489] 30. 如权利要求24-29中任一项所述的治疗性组合物,其中所述治疗性组合物是无菌的。
- [0490] 31. 如权利要求30所述的治疗性组合物,其中所述治疗性组合物不促进微生物生长。
- [0491] 32. 如实施方案24至31中任一项所述的治疗性组合物,其中所述治疗性组合物包含小于约0.5EU/mL的内毒素水平。
- [0492] 33. 如实施方案24至32中任一项所述的治疗性组合物,其中所述rAAV颗粒包含AAV9衣壳蛋白。
- [0493] 34. 如实施方案24至33中任一项所述的治疗性组合物,其中大于约 $1.0E+13$ vg/mL的所述rAAV包含所述基因产物。
- [0494] 35. 如实施方案24至34中任一项所述的治疗性组合物,其中所述rAAV的TCID₅₀滴度为约1,000vg/IU至约6,000vg/IU。
- [0495] 36. 如实施方案24至35中任一项所述的治疗性组合物,其中所述基因产物是GCase。
- [0496] 37. 如实施方案36所述的治疗性组合物,其中GCase活性至少为相对于参考标准的110%,其中所述参考标准是编码GCase的纯化的rAAV。
- [0497] 38. 如实施方案24至37中任一项所述的治疗性组合物,其中感染滴度为约 $8.0E+9$ IU/mL至约 $1.2E+10$ IU/mL。
- [0498] 39. 如实施方案24至38中任一项所述的治疗性组合物,其中渗透压介于约300mOsm/kg与约500mOsm/kg之间。
- [0499] 40. 如实施方案24至39中任一项所述的治疗性组合物,其中pH介于约7与约9之间。
- [0500] 41. 如实施方案24至40中任一项所述的治疗性组合物,其中所述治疗性组合物不含可见颗粒。
- [0501] 42. 如实施方案24至41中任一项所述的治疗性组合物,其中所述治疗性组合物包含每个容器少于约6000个大于约 $10\mu\text{m}$ 的颗粒,以及每个容器少于约600个大于约 $25\mu\text{m}$ 的颗

粒。

[0502] 43. 如实施方案24至42中任一项所述的治疗性组合物,其中所述治疗性组合物包含小于或等于约3%的聚集体。

[0503] 44. 如实施方案24至43中任一项所述的治疗性组合物,其中所述治疗性组合物包含约300 μ g/mL至约1000 μ g/mL的总蛋白水平。

[0504] 45. 如实施方案24至44中任一项所述的治疗性组合物,其中所述rAAV的纯度大于约90%v/v。

[0505] 46. 如实施方案45所述的治疗性组合物,其中所述治疗性组合物不包含大于约5%v/v的任何单一杂质。

[0506] 47. 如实施方案24至46中任一项所述的治疗性组合物,其中所述治疗性组合物包含约0.0007%至约0.0012%的普朗尼克。

[0507] 48. 如实施方案24至47中任一项所述的治疗性组合物,其中所述治疗性组合物包含小于约 5.5×10^4 个拷贝RNA/mL的弹状病毒。

[0508] 49. 如实施方案24至48中任一项所述的治疗性组合物,其中所述容器中所述治疗性组合物的可提取体积等于或大于约1.0mL。

[0509] 表34:序列表

[0510]

GCase 氨基酸序列	<p>MEFSSPSREECPKPLSRVSIAGSLTGLLLLQAVSWASG ARPCIPKSFYSSVVCVNATYCDSFDPPTFPALGTFSTRY ESTRSGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQKV KGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKSYFSEEGIGYN IIRVPMASCDIFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDTKLK IPLIHRALQLAQRPVSLASPWTSPTWLKTNGAVNGKGS LKGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTAE NEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQDRDFIARDLGPPLANST HHNVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIA VHWYLDLFLAPAKATLGETHRLFPNTMLFASEACVGSKF WEQSVRLGSDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWTDWNLA LNPEGGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHF SKFIPEGSQRVGLVASQKNDLDAVALMHPDGSVVVVV NRSSKDVPLTIKDPVGFLETISPGYSIHTYLRWRQ (SEQ ID NO: 1)</p>
编码 GCase 的密码子优化核苷酸序列	<p>atggaattcagcagccccagcagagaggaatgccccagcctctgagccgggtgca atcatggccggatctctgacaggactgctgctcctcaggccgtgcttggccttctgg cgtagaccttgatccccagagcttcggctacagcagcgtcgtgctgctgcaat gccacctactgcgacagcttcgacctcctaccttctgctctggcacttcagcag atacgagagcaccagatccggcagacggatggaactgagcatgggacctaccagg ccaatcacacaggcactggcctgctgctgacactgcagcctgagcagaaatccaga aagtgaaggcttcggcggagccatgacagatgccgccctctgaatatcctgctct gtctccaccagctcagaacctgctgctcaagagctacttcagcaggaaggcatcgg ctacaacatcatcagagtgcacctggccagctgcgacttcagcatcaggacctacac tacgccgacaccccagcattccagctgcacaacttcagcctgctgaaaggagaca ccaagctgaagatccctctgatccacagagccctgcagctggcacaagaccggtg cactgctggcctctccatggacatctcccacctggctgaaaacaaatggcgcctgaa tggcaagggcagcctgaaaggccaacctggcgacatctaccaccagacctgggcca gatactctggaagtctctggagcctatgccgagcacaagctgcagtttgggcccgtg acagccgagaacgaacctctgctggactgctgagcggctacctctcagtgctgg gctttacaccgagcaccagcgggactttatgcccgtgatctgggacctacactggc caatagcaccaccataatgtcggctgctgatgctggagcaccagagactgcttctg cccactgggctaaagtgtgctgacagatcctgaggccgccaatacgtgcacgga atcgcctgactggtatctgactttctggcccctgccaaggccacactgggagaga cacacagactgttcccaacacctgctgttccagcgaagcctgtgtggcagcaa gtttgggaacagagcgtgcggctcggcagctgggatagaggcatgagtacagcca cagcatcatcacaacctgctgtaccacgtcgtcggctggaccgactggaatctggcc ctgaatcctgaaggcggccctaactgggtccgaaactcgtggacagccccatcatcg tggacatcacaaggacacctctacaagcagccatgttctaccacctgggacacttc agcaagttcatccccagggtctctcagcgcgttgactggtgcttccagaagaac gatctggacgccgtgctctgatgcacctgatggatctgctgtggtggtgctgaa</p>

	ccgcagcagcaaatgatgtgccctgaccatcaaggatcccgcctgggattcctgga aacaatcagccctggctactccatccacacactactgtggcgtagacag (SEQ ID NO: 2)
颗粒蛋白前体氨基酸序列	MWTLVSWVALTAGLVAGTRCPDGQFCPVACCLDPGGA SYSCCRPLLDKWPPTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFT VSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQ RSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPM PQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKL PAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSGKY GCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKLSKENAT TDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDPGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGP HQV PWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQ LTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTC PSLGGSWACQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARS CEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAAR GTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQLL (SEQ ID NO: 3)
编码颗粒蛋白前体的密码子优化核苷酸序列	atgtggaccctggtagctgggtggccctgaccgcccgcctgggcccgcaccgg ctccccgacggccagtctgcccctggcctgctgctggaacccggcgccgcca gctacagctgctgcccccctgctggacaagtggcccaccacctgagcggccacc tgggcccgcctgcccagtgtagcggcactgagcggccgacagctgcatctc accgtgagcggcaccagcagctgctgcccctccccgagcctggcctgcgccga cggccaccactgctgccccgcggctccactgagcggcggcggcagctgctt ccagcgcagcggcaacaacagctggggcgcctaccagtgccccgacagccagttcg agtccccgacttcagcacctgctgctgtagtgtagcggcagctgggctgctgcc ccatgccccagccagctgctgagagaccgctgcaactgctgccccacggcgcc ttctgagactggtgacacccgctgcatcaccaccggcaccaccacctggcc aagaagctgcccgccagcgcaccaaccgcccgtggcctgagcagcagcgtgat gtgccccgagcccgcagcggctgccccgacggcagcactgctgagcagctgccc gcggcaagtacggctgctgcccctgcccacgcccactgctgagcggcaccactg cactgctgccccagcaccctgctgagcctgatccagagcaagtgcctgagcaag gagaacgccaccaccgactgctgaccaagctgcccgccacaccgtggggcagct gaagtgcacatggaggtgagctgccccgacggctacactgctgcccctgcaga gcggcgcctgggctgctgcccctcaccaggcctgctgctgagagaccacatcc actgctgccccgcggcttaccctgagcaccagaaaggcactgagcagaggcc ccccaccaggtgcccctgatggagaaggccccgccacctgagcctgccccacc ccagccctgaagcgcgacgtgcccctgagacaactgagcagctgccccagcagc gacactgctgcccagctgaccagcggcagtgaggctgctgccccatccccgaggc cgtgtgctgagcagaccaccagcactgctgccccagggctacactgctgaggcca gggccagtgccagcgcggcagcagatcgtggccggcctggagaagatcccggc cgccgcgacgctgagccacccccgcacatcggctgagaccagcaccagct gccccgtggccagactgctgccccagcctggcggcagctgggctgctgcccag ctgccccagcctgctgctgagagaccgcccagcactgctgccccgcccgtacac ctgcaactgaaggcccgcagctgagagaaggagtggtgagcggccagcccggc accttctgcccgcagccccacgtggcgtaaggacgtgagtgaggcggcagg gccacttctgcccagacaaccagactgctgcccgcacaaccgccagggtgggccc tctgcccctaccgccaggcgtgctgctgcccggaccgcccactgctgccccggc ggcttccgctgcccggcccggcaccagaagtcctgcccggcggagggccccggctg ggagccccctgcccagccccgcctgcccagctgctg
野生型 AAV2 ITR	aggaaccctagtgatggagttgccactccctctctgcccctgctgctgctcactga ggccggcgaccacaaggctccccagccccggctttgccccggggcctcagtg agcagcgcagcgcgagagaggagtgccaa

[0511]

[0512]	编码靶向 α -突触核蛋白的抑制性核酸的核苷酸序列	(SEQ ID NO: 5) tgaagacttcgagatacactgt (SEQ ID NO: 12)
--------	----------------------------------	---

序列表

<110> 普利维尔治疗公司(Prevail Therapeutics, Inc.)

<120> 重组腺相关病毒组合物及其产生方法

<130> PRVL-013/01W0 334806-2132

<150> US 63/092,179

<151> 2020-10-15

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 536

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

```

Met Glu Phe Ser Ser Pro Ser Arg Glu Glu Cys Pro Lys Pro Leu Ser
1           5           10           15
Arg Val Ser Ile Met Ala Gly Ser Leu Thr Gly Leu Leu Leu Leu Gln
           20           25           30
Ala Val Ser Trp Ala Ser Gly Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe
           35           40           45
Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser
           50           55           60
Phe Asp Pro Pro Thr Phe Pro Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu
65           70           75           80
Ser Thr Arg Ser Gly Arg Arg Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln
           85           90           95
Ala Asn His Thr Gly Thr Gly Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln
           100          105          110
Lys Phe Gln Lys Val Lys Gly Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala
           115          120          125
Ala Leu Asn Ile Leu Ala Leu Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu
           130          135          140
Lys Ser Tyr Phe Ser Glu Glu Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val
145          150          155          160
Pro Met Ala Ser Cys Asp Phe Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp
           165          170          175
Thr Pro Asp Asp Phe Gln Leu His Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp
           180          185          190
Thr Lys Leu Lys Ile Pro Leu Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln

```

195	200	205
Arg Pro Val Ser Leu Leu	Ala Ser Pro Trp Thr	Ser Pro Thr Trp Leu
210	215	220
Lys Thr Asn Gly Ala Val	Asn Gly Lys Gly Ser	Leu Lys Gly Gln Pro
225	230	235
Gly Asp Ile Tyr His Gln	Thr Trp Ala Arg Tyr	Phe Val Lys Phe Leu
245	250	255
Asp Ala Tyr Ala Glu His	Lys Leu Gln Phe Trp	Ala Val Thr Ala Glu
260	265	270
Asn Glu Pro Ser Ala Gly	Leu Leu Ser Gly Tyr	Pro Phe Gln Cys Leu
275	280	285
Gly Phe Thr Pro Glu His	Gln Arg Asp Phe Ile	Ala Arg Asp Leu Gly
290	295	300
Pro Thr Leu Ala Asn Ser	Thr His His Asn Val	Arg Leu Leu Met Leu
305	310	315
Asp Asp Gln Arg Leu Leu	Leu Pro His Trp Ala	Lys Val Val Leu Thr
325	330	335
Asp Pro Glu Ala Ala Lys	Tyr Val His Gly Ile	Ala Val His Trp Tyr
340	345	350
Leu Asp Phe Leu Ala Pro	Ala Lys Ala Thr Leu	Gly Glu Thr His Arg
355	360	365
Leu Phe Pro Asn Thr Met	Leu Phe Ala Ser Glu	Ala Cys Val Gly Ser
370	375	380
Lys Phe Trp Glu Gln Ser	Val Arg Leu Gly Ser	Trp Asp Arg Gly Met
385	390	395
Gln Tyr Ser His Ser Ile	Ile Thr Asn Leu Leu	Tyr His Val Val Gly
405	410	415
Trp Thr Asp Trp Asn Leu	Ala Leu Asn Pro Glu	Gly Gly Pro Asn Trp
420	425	430
Val Arg Asn Phe Val Asp	Ser Pro Ile Ile Val	Asp Ile Thr Lys Asp
435	440	445
Thr Phe Tyr Lys Gln Pro	Met Phe Tyr His Leu	Gly His Phe Ser Lys
450	455	460
Phe Ile Pro Glu Gly Ser	Gln Arg Val Gly Leu	Val Ala Ser Gln Lys
465	470	475
Asn Asp Leu Asp Ala Val	Ala Leu Met His Pro	Asp Gly Ser Ala Val
485	490	495
Val Val Val Leu Asn Arg	Ser Ser Lys Asp Val	Pro Leu Thr Ile Lys
500	505	510

Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile
 515 520 525

His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg Gln
 530 535

<210> 2

<211> 1608

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 密码子优化的葡糖脑苷脂酶

<400> 2

```

atggaattca gcagccccag cagagaggaa tgccccaaagc ctctgagccg ggtgtcaatc 60
atggccggat ctctgacagg actgetgetg cttcaggccg tgtcttgggc ttctggcgct 120
agaccttgca tccccaaagag cttcggetac agcagcgtcg tgtgcgtgtg caatgccacc 180
tactgcgaca gcttcgaccc tctaccttt cctgctctgg gcaccttcag cagatacgag 240
agcaccagat ccggcagacg gatggaactg agcatgggac ccatccaggc caatcacaca 300
ggcactggcc tgctgctgac actgcagcct gagcagaaat tccagaaagt gaaaggcttc 360
ggcggagcca tgacagatgc cgccgctctg aatatcctgg ctctgtctcc accagctcag 420
aacctgctgc tcaagagcta cttcagcgag gaaggcatcg gctacaacat catcagagtg 480
cccatggcca gctgcgactt cagcatcagg acctacacct acgccgacac acccgacgat 540
ttccagctgc acaacttcag cctgcctgaa gaggacacca agctgaagat ccctctgate 600
cacagagccc tgcagctggc acaaagacc gtgtcactgc tggcctctcc atggacatct 660
cccacctggc tgaaaacaaa tggcgccgtg aatggcaagg gcagcctgaa aggccaacct 720
ggcgacatct accaccagac ctgggccaga tacttctgta agttcctgga cgcctatgcc 780
gagcacaagc tgcagttttg ggccgtgaca gccgagaacg aaccttctgc tggactgctg 840
agcggctacc cttttcagtg cctgggcttt acaccgagc accagcggga ctttatcgcc 900
cgtgatctgg gaccacact ggccaatagc accaccata atgtgaggct gctgatgctg 960
gacgaccaga gactgcttct gccccactgg gctaaagtgg tgctgacaga tctgaggcc 1020
gccaataacg tgcacggaat cgccgtgac tggatatctg actttctggc ccctgccaaag 1080
gccacactgg gagagacaca cagactgttc cccaacacca tgctgttcgc cagcgaagcc 1140
tgtgtgggca gcaagttttg ggaacagagc gtgcggctcg gcagctggga tagaggcatg 1200
cagtacagcc acagcatcat caccaacctg ctgtaccaag tcgtcggctg gaccgactgg 1260
aatctggccc tgaatcctga aggcggeect aactgggtcc gaaacttctg ggacagcccc 1320
atcatcgtgg acatcaccaa ggacacette tacaagcagc ccatgttcta ccacctggga 1380
cacttcagca agttcatccc cgagggetct cagcgcgttg gactggtggc ttcccagaag 1440
aacgatctgg acgccgtggc tetgatgeac cctgatggat ctgctgtggt ggtggtcctg 1500
aaccgcagca gcaaagatgt gccctgacc atcaaggatc ccgccgtggg attcctggaa 1560
acaatcagcc ctggctactc catccacacc tacctgtggc gtagacag 1608

```

<210> 3

<211> 593
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 3
 Met Trp Thr Leu Val Ser Trp Val Ala Leu Thr Ala Gly Leu Val Ala
 1 5 10 15
 Gly Thr Arg Cys Pro Asp Gly Gln Phe Cys Pro Val Ala Cys Cys Leu
 20 25 30
 Asp Pro Gly Gly Ala Ser Tyr Ser Cys Cys Arg Pro Leu Leu Asp Lys
 35 40 45
 Trp Pro Thr Thr Leu Ser Arg His Leu Gly Gly Pro Cys Gln Val Asp
 50 55 60
 Ala His Cys Ser Ala Gly His Ser Cys Ile Phe Thr Val Ser Gly Thr
 65 70 75 80
 Ser Ser Cys Cys Pro Phe Pro Glu Ala Val Ala Cys Gly Asp Gly His
 85 90 95
 His Cys Cys Pro Arg Gly Phe His Cys Ser Ala Asp Gly Arg Ser Cys
 100 105 110
 Phe Gln Arg Ser Gly Asn Asn Ser Val Gly Ala Ile Gln Cys Pro Asp
 115 120 125
 Ser Gln Phe Glu Cys Pro Asp Phe Ser Thr Cys Cys Val Met Val Asp
 130 135 140
 Gly Ser Trp Gly Cys Cys Pro Met Pro Gln Ala Ser Cys Cys Glu Asp
 145 150 155 160
 Arg Val His Cys Cys Pro His Gly Ala Phe Cys Asp Leu Val His Thr
 165 170 175
 Arg Cys Ile Thr Pro Thr Gly Thr His Pro Leu Ala Lys Lys Leu Pro
 180 185 190
 Ala Gln Arg Thr Asn Arg Ala Val Ala Leu Ser Ser Ser Val Met Cys
 195 200 205
 Pro Asp Ala Arg Ser Arg Cys Pro Asp Gly Ser Thr Cys Cys Glu Leu
 210 215 220
 Pro Ser Gly Lys Tyr Gly Cys Cys Pro Met Pro Asn Ala Thr Cys Cys
 225 230 235 240
 Ser Asp His Leu His Cys Cys Pro Gln Asp Thr Val Cys Asp Leu Ile
 245 250 255
 Gln Ser Lys Cys Leu Ser Lys Glu Asn Ala Thr Thr Asp Leu Leu Thr
 260 265 270
 Lys Leu Pro Ala His Thr Val Gly Asp Val Lys Cys Asp Met Glu Val

275	280	285
Ser Cys Pro Asp Gly Tyr Thr	Cys Cys Arg Leu Gln Ser Gly Ala Trp	
290	295	300
Gly Cys Cys Pro Phe Thr Gln Ala Val Cys Cys Glu Asp His Ile His		
305	310	315
Cys Cys Pro Ala Gly Phe Thr Cys Asp Thr Gln Lys Gly Thr Cys Glu		
325	330	335
Gln Gly Pro His Gln Val Pro Trp Met Glu Lys Ala Pro Ala His Leu		
340	345	350
Ser Leu Pro Asp Pro Gln Ala Leu Lys Arg Asp Val Pro Cys Asp Asn		
355	360	365
Val Ser Ser Cys Pro Ser Ser Asp Thr Cys Cys Gln Leu Thr Ser Gly		
370	375	380
Glu Trp Gly Cys Cys Pro Ile Pro Glu Ala Val Cys Cys Ser Asp His		
385	390	395
Gln His Cys Cys Pro Gln Gly Tyr Thr Cys Val Ala Glu Gly Gln Cys		
405	410	415
Gln Arg Gly Ser Glu Ile Val Ala Gly Leu Glu Lys Met Pro Ala Arg		
420	425	430
Arg Ala Ser Leu Ser His Pro Arg Asp Ile Gly Cys Asp Gln His Thr		
435	440	445
Ser Cys Pro Val Gly Gln Thr Cys Cys Pro Ser Leu Gly Gly Ser Trp		
450	455	460
Ala Cys Cys Gln Leu Pro His Ala Val Cys Cys Glu Asp Arg Gln His		
465	470	475
Cys Cys Pro Ala Gly Tyr Thr Cys Asn Val Lys Ala Arg Ser Cys Glu		
485	490	495
Lys Glu Val Val Ser Ala Gln Pro Ala Thr Phe Leu Ala Arg Ser Pro		
500	505	510
His Val Gly Val Lys Asp Val Glu Cys Gly Glu Gly His Phe Cys His		
515	520	525
Asp Asn Gln Thr Cys Cys Arg Asp Asn Arg Gln Gly Trp Ala Cys Cys		
530	535	540
Pro Tyr Arg Gln Gly Val Cys Cys Ala Asp Arg Arg His Cys Cys Pro		
545	550	555
Ala Gly Phe Arg Cys Ala Ala Arg Gly Thr Lys Cys Leu Arg Arg Glu		
565	570	575
Ala Pro Arg Trp Asp Ala Pro Leu Arg Asp Pro Ala Leu Arg Gln Leu		
580	585	590

Leu

<210> 4

<211> 1779

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 密码子优化的颗粒蛋白前体

<400> 4

```

atgtggacc  tggtagctg  ggtggccctg  accgccggcc  tggtagccgg  caccgctgc  60
cccgcaggcc  agttctgcc  cgtggcctgc  tgctggacc  cggcgggcgc  cagctacagc  120
tgctgccgcc  ccctgctgga  caagtggccc  accacctga  gccgccacct  gggcgggccc  180
tgccagggtg  acgcccactg  cagcgccggc  cacagctgca  tcttaccctg  gageggcacc  240
agcagctgct  gccccttccc  cgaggccctg  gctgcggcg  acggccacca  ctgctgcccc  300
cgcggcttcc  actgcagcgc  cgacggccgc  agctgcttcc  agcgcagcgg  caacaacagc  360
gtggggcgcca  tccagtgcc  cgacagccag  ttgagtgcc  ccgacttcag  cacctgctgc  420
gtgatgggtg  acggcagctg  gggctgctgc  cccatgcccc  aggccagctg  ctgcgaggac  480
cgcgtgcact  gctgccccca  cggcgcttcc  tgcgacctgg  tgcacaccgc  ctgcatcacc  540
cccaccggca  cccaccccct  ggccaagaag  ctgcccggcc  agcgcaccaa  ccgcgccctg  600
gccctgagca  gcagcgtgat  gtgccccgac  gcccgagcc  gctgccccga  cggcagcacc  660
tgctgcgagc  tgcccagcgg  caagtacggc  tgctgcccc  tgcccacgc  cacctgctgc  720
agcgaccacc  tgactgctg  cccccaggac  accgtgtgcg  acctgatcca  gagcaagtgc  780
ctgagcaagg  agaacgccac  caccgacctg  ctgaccaagc  tgcccggcca  caccgtgggc  840
gacgtgaagt  gcgacatgga  ggtgagctgc  cccgacggct  acacctgctg  ccgctgcag  900
agcggcgcct  ggggctgctg  ccccttacc  caggccgtgt  gctgcgagga  ccacatccac  960
tgctgccccg  ccggcttcac  ctgcgacacc  cagaagggca  cctgcgagca  gggccccacc  1020
caggtgccct  ggatggagaa  ggccccgcc  cacctgagcc  tgcccgacc  ccaggccctg  1080
aagcgcgacg  tgccctgcga  caactgagc  agctgcccc  gcagcgacac  ctgctgccag  1140
ctgaccagcg  gcgagtggg  ctgctgcccc  atccccgagg  ccgtgtgctg  cagcgaccac  1200
cagcactgct  gccccaggg  ctacacctgc  gtggccgagg  gccagtcca  gcgcggcagc  1260
gagatcgtgg  ccggcctgga  gaagatgcc  gcccgccgc  ccagcctgag  ccacccccgc  1320
gacatcggct  gcgaccagca  caccagctgc  cccgtgggcc  agacctgctg  cccagcctg  1380
ggcggcagct  gggcctgctg  ccagctgcc  cagccctgt  gctgcgagga  ccgccagcac  1440
tgctgccccg  ccggtacac  ctgcaactg  aaggcccga  gctgcgagaa  ggaggtggtg  1500
agcggccagc  ccgccacctt  cctgccccgc  agccccacg  tggcgctgaa  ggacgtggag  1560
tgccggcagc  gccacttctg  ccacgacaac  cagacctgct  gccgcgaaa  ccgccagggc  1620
tgggcctgct  gcccctacc  ccaggcgctg  tgctgcgcc  accgcccca  ctgctgcccc  1680
gccggcttcc  gctgcgccgc  ccgcggcacc  aagtgcctgc  gccgcgagc  ccccgcctgg  1740
gacgcccccc  tgcgcgacc  cgccctgcgc  cagctgctg  1779

```

<210> 5

- <211> 145
<212> DNA
<213> 依赖性细小病毒腺相关病毒2 (Dependoparvovirus Adeno-associated virus
2)
<400> 5
aggaaccct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc 120
gagcgcgcag agagggagtg gccaa 145
<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> AAV9-GBA1特异性引物
<400> 6
gactgtggga tccgttcgaa 20
<210> 7
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> AAV9-GBA1特异性引物
<400> 7
gattgacacc cggctcaga 19
<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> AAV9-GBA1特异性探针
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (1)
<223> 6-FAM荧光染料附着
<220>
<221> misc_feature
<222> (23) .. (23)
<223> TAMRA荧光染料附着
<400> 8

ccatggaatt cagcagcccc agc 23
<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> AAV9-GRN特异性引物
<400> 9
gtcttccacg actgtgggat 20
<210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> AAV9-GRN特异性引物
<400> 10
gtcagggcca cccagctc 18
<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> AAV9-GRN特异性探针
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (1)
<223> 6-FAM荧光染料附着
<220>
<221> misc_feature
<222> (24) .. (24)
<223> TAMRA荧光染料附着
<400> 11
ccggttgagc caccatgtgg accc 24
<210> 12
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 靶向 α -突触核蛋白的抑制性核酸

<400> 12

tggaagactt cgagatacac tgt 23

	重复1-4						重复1-4						重复1-4											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
A	RS 稀释 1	RS 稀释 1	RS 稀释 1	RS 稀释 1	TS1 稀释 1	TS1 稀释 1	TS1 稀释 1	TS1 稀释 1	TS2 稀释 1	TS2 稀释 1	TS2 稀释 1	TS2 稀释 1	RS 稀释 1	RS 稀释 2	RS 稀释 3	RS 稀释 4	RS 稀释 5	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6
B	RS 稀释 2	RS 稀释 2	RS 稀释 2	RS 稀释 2	TS1 稀释 2	TS1 稀释 2	TS1 稀释 2	TS1 稀释 2	TS2 稀释 2	TS2 稀释 2	TS2 稀释 2	TS2 稀释 2	RS 稀释 2	RS 稀释 3	RS 稀释 3	RS 稀释 4	RS 稀释 5	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6
C	RS 稀释 3	RS 稀释 3	RS 稀释 3	RS 稀释 3	TS1 稀释 3	TS1 稀释 3	TS1 稀释 3	TS1 稀释 3	TS2 稀释 3	TS2 稀释 3	TS2 稀释 3	TS2 稀释 3	RS 稀释 3	RS 稀释 4	RS 稀释 4	RS 稀释 5	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6
D	RS 稀释 4	RS 稀释 4	RS 稀释 4	RS 稀释 4	TS1 稀释 4	TS1 稀释 4	TS1 稀释 4	TS1 稀释 4	TS2 稀释 4	TS2 稀释 4	TS2 稀释 4	TS2 稀释 4	RS 稀释 4	RS 稀释 5	RS 稀释 5	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6
E	RS 稀释 5	RS 稀释 5	RS 稀释 5	RS 稀释 5	TS1 稀释 5	TS1 稀释 5	TS1 稀释 5	TS1 稀释 5	TS2 稀释 5	TS2 稀释 5	TS2 稀释 5	TS2 稀释 5	RS 稀释 5	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6
F	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	TS1 稀释 6	TS1 稀释 6	TS1 稀释 6	TS1 稀释 6	TS2 稀释 6	TS2 稀释 6	TS2 稀释 6	TS2 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6	RS 稀释 6
G	FB	FB	FB	FB	FB	FB	FB	FB	FB	FB	FB	FB	FB	FB	FB	FB	FB	FB	FB	FB	FB	FB	FB	FB
H	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白	空白

图1

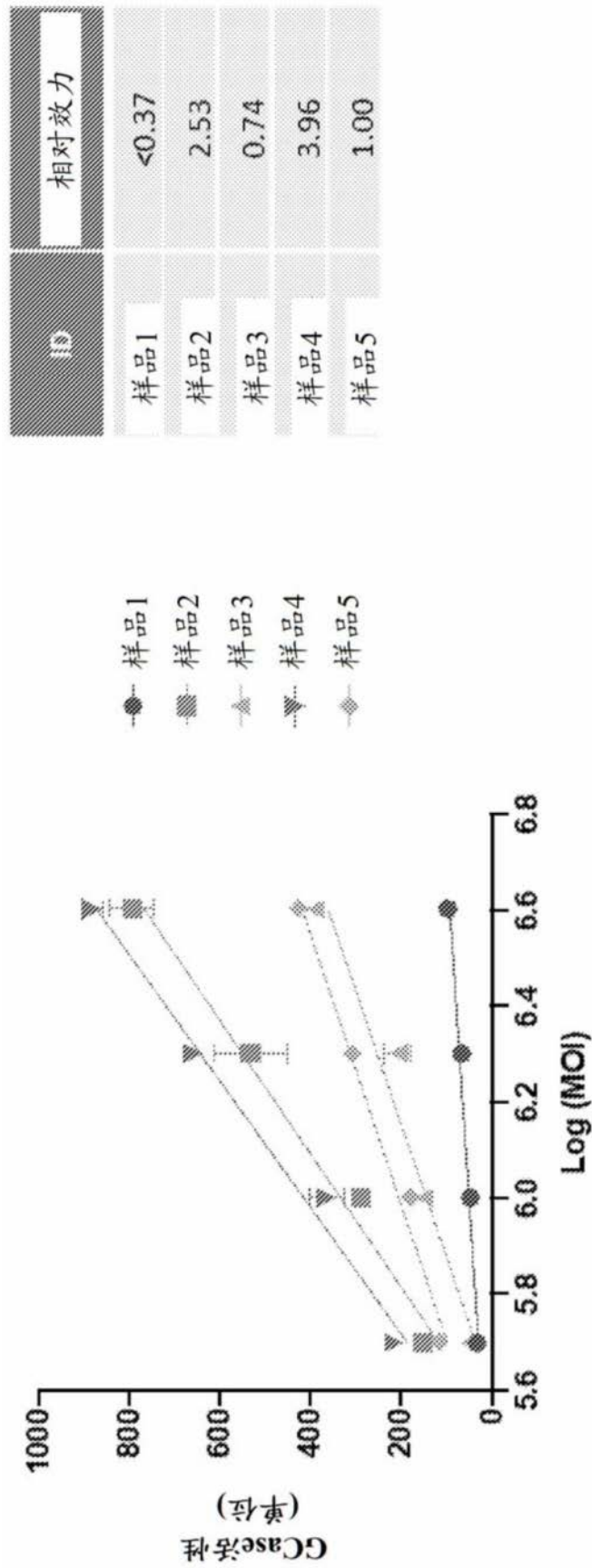


图2

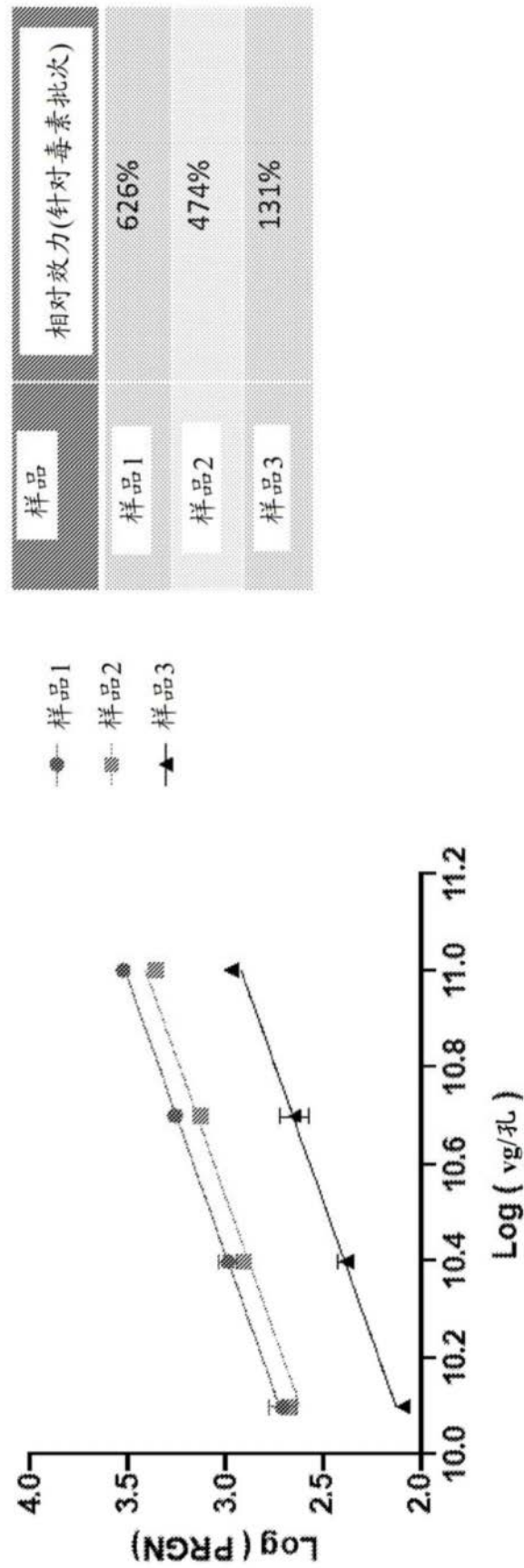


图3