



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115335704 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 11

(21) 申请号 202180023044.4

(22) 申请日 2021.05.10

(30) 优先权数据

63/023,629 2020.05.12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.09.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/031577 2021.05.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/231296 EN 2021.11.18

(71) 申请人 隆萨休斯敦股份有限公司

地址 美国德克萨斯州

(72) 发明人 王鹏 顾炳南 A·赛思

(74) 专利代理机构 深圳市百瑞专利商标事务所

(普通合伙) 44240

专利代理师 金辉

(51) Int.Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

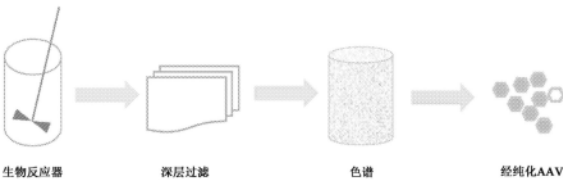
权利要求书3页 说明书17页 附图8页

(54) 发明名称

用于检测腺相关病毒的方法和试剂盒

(57) 摘要

本公开提供了用于检测腺相关病毒的方法和试剂盒。在一些实施例中,所述腺相关病毒是Anc80。检测方法包含基于HPLC和ELISA的方法。



1. 一种用于检测样品中的腺相关病毒血清型Anc80的方法,所述方法包括:
 - (a) 使所述样品与以下接触: (i) 捕获试剂,所述捕获试剂与腺相关病毒 (AAVx) 或腺相关病毒血清型8 (AAV8) 结合;以及 (ii) 检测试剂,所述检测试剂与腺相关病毒 (AAVx) 结合;
 - (b) 形成包括所述捕获试剂、所述Anc80和所述检测试剂的结合复合物;以及
 - (c) 检测所述结合复合物,由此检测所述样品中的所述Anc80。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述捕获试剂和/或所述检测试剂是抗体或其抗原结合片段。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述捕获试剂固定在表面上。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述捕获试剂包括生物素,并且所述表面包括亲和素或链霉亲和素。
5. 根据权利要求3或4所述的方法,其中所述表面是多孔板,并且所述捕获试剂固定在所述多孔板的孔中。
6. 根据权利要求1到5中任一项所述的方法,其中所述捕获试剂与AAVx结合。
7. 根据权利要求1到5中任一项所述的方法,其中所述捕获试剂与AAV8结合。
8. 根据权利要求1到7中任一项所述的方法,其中所述捕获试剂与所述Anc80的病毒颗粒结合。
9. 根据权利要求7所述的方法,其中所述捕获试剂与VP3结合。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述捕获试剂与VP3的残基580到600内的表位结合。
11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述捕获试剂与LQSANT (SEQ ID NO:1) 结合。
12. 根据权利要求1到11中任一项所述的方法,其中所述检测试剂与AAVx结合。
13. 根据权利要求1到11中任一项所述的方法,其中所述检测试剂与AAV8结合。
14. 根据权利要求1到13中任一项所述的方法,其中所述检测试剂与所述Anc80的病毒颗粒结合。
15. 根据权利要求1到14中任一项所述的方法,其中所述检测试剂包括可检测部分的结合配偶体。
16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述检测试剂包括生物素,并且所述可检测部分包括与亲和素或链霉亲和素缀合的辣根过氧化物酶。
17. 根据权利要求1所述的方法,其中所述捕获试剂与AAV8结合,并且所述检测试剂与AAVx结合。
18. 一种试剂盒,其包括:
 - (a) 捕获试剂,所述捕获试剂与腺相关病毒 (AAVx) 或腺相关病毒血清型8 (AAV8) 结合;以及
 - (b) 检测试剂,所述检测试剂与腺相关病毒 (AAVx) 结合。
19. 根据权利要求18所述的试剂盒,其中所述捕获试剂和/或所述检测试剂是抗体或其抗原结合片段。
20. 根据权利要求18或19所述的试剂盒,其进一步包括捕获表面。
21. 根据权利要求20所述的试剂盒,其中所述捕获试剂包括生物素,并且所述捕获表面包括与其连接的亲和素或链霉亲和素。

22. 根据权利要求20或21所述的试剂盒,其中所述捕获表面是多孔板,并且所述捕获试剂固定在所述多孔板的孔上。

23. 根据权利要求18到22中任一项所述的试剂盒,其中所述捕获试剂与AAV_x结合。

24. 根据权利要求18到22中任一项所述的试剂盒,其中所述捕获试剂与AAV8结合。

25. 根据权利要求18到24中任一项所述的试剂盒,其中所述捕获试剂与所述Anc80的衣壳蛋白(VP)结合。

26. 根据权利要求24所述的试剂盒,其中所述捕获试剂与VP3结合。

27. 根据权利要求26所述的试剂盒,其中所述捕获试剂与VP3的残基580到600内的表位结合。

28. 根据权利要求27所述的试剂盒,其中所述捕获试剂与LQSANT (SEQ ID NO:1) 结合。

29. 根据权利要求18到28中任一项所述的试剂盒,其中所述检测试剂与AAV_x结合。

30. 根据权利要求18到28中任一项所述的试剂盒,其中所述检测试剂与AAV8结合。

31. 根据权利要求18到30中任一项所述的试剂盒,其中所述检测试剂与所述Anc80的病毒颗粒结合。

32. 根据权利要求18到31中任一项所述的试剂盒,其进一步包括可检测部分,并且所述检测试剂包括所述可检测部分的结合配偶体。

33. 根据权利要求32所述的试剂盒,其中所述检测试剂包括生物素,并且所述可检测部分包括与亲和素或链霉亲和素缀合的辣根过氧化物酶。

34. 根据权利要求18到33中任一项所述的试剂盒,其中所述捕获试剂、所述检测试剂或两者均是冻干的。

35. 根据权利要求18到33中任一项所述的试剂盒,其中所述捕获试剂、所述检测试剂或两者均以溶液形式提供。

36. 根据权利要求18到35中任一项所述的试剂盒,其进一步包括以下中的一种或多种: 缓冲液、测定终止溶液、校准试剂、能够与所述检测试剂结合的可检测部分和可检测底物。

37. 根据权利要求18所述的试剂盒,其中所述捕获试剂与AAV8结合,并且所述检测试剂与AAV_x结合。

38. 一种测定细胞悬浮液或细胞裂解物中的腺相关病毒的衣壳滴度的方法,所述方法包括:

(a) 使所述细胞悬浮液或细胞裂解物经历高效液相色谱(HPLC),其中所述HPLC是用与所述腺相关病毒的病毒颗粒(VP)结合的树脂进行的;以及

(b) 检测所述细胞悬浮液或细胞裂解物中的所述VP,由此测定所述腺相关病毒的衣壳滴度。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中所述检测包括在280nm下用分光光度法检测衣壳蛋白。

40. 根据权利要求38所述的方法,其中所述腺相关病毒包括荧光部分,并且所述检测包括荧光检测。

41. 根据权利要求38到40中任一项所述的方法,其中所述细胞裂解物是未纯化的细胞裂解物或部分纯化的细胞裂解物。

42. 根据权利要求38到41中任一项所述的方法,其中所述HPLC是用包含在体积为约

0.1mL到约1.0mL的柱中的所述树脂进行的。

43. 根据权利要求38到42中任一项所述的方法,其中所述树脂包括抗体或其抗原结合片段。

44. 根据权利要求38到43中任一项所述的方法,其中所述腺相关病毒包括Anc80。

用于检测腺相关病毒的方法和试剂盒

技术领域

[0001] 本公开提供了用于检测腺相关病毒的方法和试剂盒。在一些实施例中,所述腺相关病毒是Anc80。检测方法包含基于HPLC和ELISA的方法。

背景技术

[0002] 腺相关病毒(AAV)已经成为基因疗法的重要工具。通常,用于基因疗法的AAV是经组装病毒颗粒,所述病毒颗粒例如缺乏天然病毒基因并且仅含有所关注序列,如所关注基因(GOI),从而产生重组AAV(rAAV)。然后,所关注基因通过rAAV颗粒递送到宿主细胞中。用于产生rAAV颗粒的典型过程涉及将至少两种质粒递送到生产细胞中:第一质粒,所述第一质粒含有所关注基因,所述所关注基因侧接反向末端重复(ITR)序列,所述序列发现于天然AAV基因组中(ITR/GOI质粒);第二质粒,所述第二质粒含有要反式表达以进行病毒组装的AAV rep/cap基因(rep/cap质粒);以及第三质粒,所述第三质粒通常含有来自腺病毒或疱疹病毒的辅助基因(辅助质粒)。然后,生产细胞产生含有ITR/GOI质粒的经组装rAAV颗粒(即,“经包装”rAAV),并且然后可以从生产细胞中分离和纯化经包装rAAV。

[0003] rAAV的纯化通常涉及:收获生产细胞;裂解生产细胞;使细胞裂解物经历梯度纯化(例如,使用碘克沙醇梯度)和/或快速蛋白液相色谱(FPLC),其可以是基于离子交换、尺寸排阻和/或亲和力的;以及缓冲液交换和浓缩,例如,使用切向流过滤。在纯化之后,通常测量rAAV滴度。例如在Naso等人,《生物制药(BioDrugs)》31(4):317-334(2017)和WO 2018/150269中进一步描述了重组AAV以及生产和纯化的方法。

[0004] 从生产细胞中纯化AAV,例如rAAV可能是一个耗时且劳动密集的过程。由于病毒滴定通常直到获得经基本上纯化的样品之后才进行,例如在大多数或所有纯化步骤之后,低产率批次(例如,低病毒颗粒数量和/或低全/空衣壳比率)直到花费大量时间和试剂之后才被检测到,这大大增加了成本并且降低了生产效率。

[0005] 与AAV产生相关的另一个挑战是大规模开发针对不同病毒载体的优化过程。上游和下游过程两者的迭代优化利用分析工具来表征和定量过程中样品的病毒产物。

发明内容

[0006] 在一些实施例中,本公开提供了一种用于检测样品中的腺相关病毒血清型Anc80的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与以下接触:(i)捕获试剂,所述捕获试剂与腺相关病毒(AAVx)或腺相关病毒血清型8(AAV8)结合;以及(ii)检测试剂,所述检测试剂与腺相关病毒(AAVx)结合;(b)形成包括所述捕获试剂、所述Anc80和所述检测试剂的结合复合物;以及(c)检测所述结合复合物,由此检测所述样品中的所述Anc80。

[0007] 在另外的实施例中,本公开提供了一种试剂盒,其包括:(a)捕获试剂,所述捕获试剂与腺相关病毒(AAVx)结合;以及(b)检测试剂,所述检测试剂与腺相关病毒(AAVx)结合。

[0008] 在另外的实施例中,本公开提供了一种测定细胞悬浮液或细胞裂解物中的腺相关病毒的衣壳滴度的方法,所述方法包括:(a)使所述细胞悬浮液或细胞裂解物经历高效液相

色谱 (HPLC), 其中所述HPLC是用与所述腺相关病毒的病毒颗粒 (VP) 结合的树脂进行的; 以及 (b) 检测所述细胞悬浮液或细胞裂解物中的所述VP, 由此测定所述腺相关病毒的衣壳滴度。

附图说明

[0009] 以下附图构成本说明书的一部分并且被包含以进一步阐述本发明的某些方面的示例性实施例。

[0010] 图1展示了根据本文中各实施例的示例性AAV纯化过程。AAV生产细胞在生物反应器中生长, 并且通过深层过滤收集。通过色谱分离和纯化AAV。

[0011] 图2A-2C示出了在实例1中描述的HPLC色谱实验的结果。图2A、2B和2C分别示出了使用同一HPLC柱从Anc80.CMV.eGFP、AAV2.CMV.eGFP和AAV8.CMV.eGFP的样品生成的标准曲线。

[0012] 图3示出了在实例1中描述的HPLC色谱实验的结果。图3示出了在AAV纯化过程的各个步骤期间或之后获得的样品的HPLC色谱图, 即, 细胞悬浮液、细胞裂解物、裂解物的澄清、切向流过滤 (TFF) 渗余物和最终过滤。

[0013] 图4示出了在实例1中描述的AAV滴度计算的结果。使用通过HPLC测量的衣壳滴度 (从图3中的结果计算) 和通过ddPCR测量的基因组滴度来测定全/空衣壳比率。

[0014] 图5示出了根据实例2用样品Anc80.CMV.eGFP进行的ELISA的标准曲线。

[0015] 图6示出了用于测定图5中所示的标准曲线的曲线拟合的4参数逻辑回归 (4-parameter logic regression) 计算。

具体实施方式

[0016] 本公开涉及用于检测腺相关病毒的方法和试剂盒。

[0017] 除非本文另外定义, 否则本公开中所使用的科学和技术术语应具有本领域的普通技术人员通常理解的含义。

[0018] 除非上下文另外要求, 否则单数术语应包含复数含义, 并且复数术语应包含单数含义。如本文所使用的, “一个 (a)” 或 “一种 (an)” 可以意指一个或多个。如本文所使用的, 当与单词 “包括 (comprising)” 结合使用时, 单词 “一个” 或 “一种” 可以意指一个或多于一个。如本文所使用的, “另一个” 或 “另外” 可以意指至少第二个或更多个。

[0019] 贯穿本申请, 术语 “约” 用于指示值包含用于测定值的方法/装置固有的误差变化或研究受试者间存在的变化。通常, 根据情况, 术语 “约” 意在涵盖大约或小于1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19% 或 20%。在一些实施例中, 由于在本文中使用术语 “约” 的上下文, 本领域的技术人员将理解由所述术语指示的可变性水平。还应当理解, 术语 “约” 的使用还包含具体列举的值。

[0020] 权利要求中对术语 “或” 的使用用于意指 “和/或”, 除非明确指出仅指替代方案或替代方案相互排斥, 尽管本公开支持仅指替代方案以及指代 “和/或” 的定义。

[0021] 如本文所使用的, 术语 “包括 (comprising)” (及其任何变体或形式, 如 “包括 (comprise)” 和 “包括 (comprises)”)、 “具有 (having)” (及其任何变体或形式, 如 “具有 (have)” 和 “具有 (has)”)、 “包含 (including)” (及其任何变体或形式, 如 “包含 (includes)”) ”

和“包含(include)”或“含有(containing)”(及其任何变体或形式,如“含有(contains)”和“含有(contain)”)是包容性的或开放性的并且不排除另外的未列举的元素或方法步骤。设想的是,本说明书中讨论的任何实施例可以关于本公开的任何方法和/或试剂盒实施。

[0022] 术语“例如(for example)”及其对应的缩写“例如(e.g.)”的使用意指所引用的特定术语是本公开的代表性实例和实施例,除非另有明确说明,否则所述代表性实例和实施例不旨在限于所参考或引用的特定实例。

[0023] 如本文所使用的,“在…之间”是包含范围末端的范围。例如,x与y之间的数字明确地包含数字x和y以及落入x和y内的任何数字。

[0024] 如本文提及的,“腺相关病毒”或“AAV”是指含有细小病毒科(Parvoviridae)和依赖细小病毒属(Dependoparvovirus)的单链DNA的小型、复制缺陷型、无包膜病毒或病毒颗粒。腺相关病毒还包含祖先AAV(Anc AAV)。AAV血清型的非限制性实例包含Anc80、Anc80L27、Anc80L65、Anc80L121、AAV1、AAV-2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、AAV16、AAV1.1、AAV2.5、AAV2i8、AAV2G9、AAV2tYF、AAV2-TT、AAV2-TT-S312N、AAV3B、AAV3B-S312N、AAV-LK3、AAV6.1、AAV6.3.1、AAV.7m8、AAV9.45、AAV.HSC1、AAV.HSC2、AAV.HSC3、AAV.HSC4、AAV.HSC5、AAV.HSC6、AAV.HSC7、AAV.HSC8、AAV.HSC9、AAV.HSC10、AAV.HSC11、AAV.HSC12、AAV.HSC13、AAV.HSC14、AAV.HSC15、AAV.HSC16、AAV.rh8、AAV.rh10、AAV.rh20、AAV.rh32、AAV.rh33、AAV.rh39、AAV.rh74、AAV.RHM4-1、AAV.RHM15-1、AAV.RHM15-2、AAV.RHM15-3、AAV.RHM15-4、AAV.RHM15-5、AAV.RHM15-6、AAV.cy10、AAV.dj、AAV.po4、AAV.po6、AAV.hu26、AAV.hu37、AAV.PHP.B、Anc126和Anc127。除了这些血清型之外,还开发了AAV假型。AAV假型含有第一血清型的衣壳和第二血清型的基因组(例如,假型AAV2/5对应于具有血清型AAV2的基因组和AAV5的衣壳的AAV)。在以下文献中描述了产生AAV的衍生物、修饰和/或假型的方法:例如Asokan等人,《分子疗法(Mol. Ther)》20(4):699-708(2012)。

[0025] 如本文所使用的,“rep”基因是指AAV基因组的本领域公认的编码AAV的复制蛋白的区,所述复制蛋白是复制病毒基因组共同地需要的。rep还指AAV基因的功能性同源物,如人疱疹病毒6(HHV-6)rep基因,其也已知介导AAV DNA复制。在一些实施例中,本文所述的AAV编码rep编码区。

[0026] 如本文所使用的,“cap”基因是指本领域公认的编码AAV的衣壳蛋白的AAV基因组区。衣壳蛋白的说明性和非限制性实例是AAV衣壳蛋白VP1、VP2和VP3。AAV衣壳蛋白相互作用以形成AAV衣壳。本公开中所使用的cap基因可以指来自任何AAV血清型或血清型组合的cap基因。

[0027] 如在AAV的上下文中所使用的,术语“重组”意指AAV是产生与天然存在的AAV不同的AAV的一个或多个程序的产物。重组AAV或rAAV是指包括至少一种AAV衣壳蛋白和衣壳化多核苷酸rAAV载体的病毒或病毒颗粒,所述衣壳化多核苷酸rAAV载体包括异源性多核苷酸(即,除了天然存在的AAV基因组之外的多核苷酸,例如,包括待递送到如哺乳动物细胞等细胞中的转基因或所关注基因)。rAAV颗粒可以是本文所述的任何血清型、假型或衍生物(例如,Anc80、AAV1、AAV-2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、AAV16,或其衍生物、修饰和/或假型)。rAAV颗粒还可以包含血清型的组合。

[0028] 如本文所使用的,术语“滴度”或“病毒滴度”是指病毒,例如本文提供的AAV的浓度。病毒滴度可以表示为病毒颗粒的数量或每mL感染单位的数量。在一些实施例中,病毒滴度是通过测量病毒组分,例如病毒衣壳或基因组的浓度来测定的。

[0029] 如本文所述,从生产细胞中纯化AAV,例如rAAV可能是一个耗时且劳动密集的过程。rAAV生产和纯化的示例性过程如图1所示。在图1中,生产细胞在生物反应器中生长至期望细胞密度。通过深层过滤收集细胞,并且使细胞经历色谱,以获得经纯化AAV。由于病毒滴定通常直到获得经基本上纯化的样品之后才进行,例如在大多数或所有纯化步骤之后,低产率批次(例如,低病毒颗粒数量和/或低全/空衣壳比率)直到花费大量时间和试剂之后才被检测到,这大大增加了成本并且降低了生产效率。

[0030] 在一些实施例中,本公开提供了一种测定由生产细胞产生的AAV滴度的分析方法。在一些实施例中,所述方法包括测量AAV衣壳滴度。在一些实施例中,所述方法包括测量AAV基因组滴度。在一些实施例中,使用同一方法来检测不同的AAV血清型,由此提供优于需要血清型特异性试剂(其可以具有不同方案)的当前方法的有效且简化的程序。例如,对于不同血清型的AAV的制造商而言,利用单一、流线型过程来检测任何AAV血清型的能力可以减少设备数量及其维护,允许设备得到更有效地利用,降低试剂、加工和劳动力成本,简化人员培训,减少不同认证的量,提高可制造性和规模化等。

[0031] 在一些实施例中,如本文所述,所述方法能够在AAV纯化过程期间从生产细胞中检测和/或滴定AAV(例如,Anc80)。所述方法有利地能够灵敏且特异性地检测和/或滴定AAV(例如,Anc80),甚至在可以含有干扰组分,如生产细胞蛋白和细胞碎片的粗制的、未纯化样品中,由此提供简单且有效的过程中AAV测试。例如,所述方法可以在90分钟或更少、75分钟或更少、60分钟或更少、或45分钟或更少的时间内进行。在一些实施例中,所述方法能够检测和/或滴定细胞裂解物中的AAV(例如,Anc80)。在一些实施例中,所述方法能够检测和/或滴定部分纯化的细胞裂解物中的AAV(例如,Anc80)。“部分纯化的”细胞裂解物是指在细胞裂解之后已经经历一个或多个下游纯化过程步骤,例如离心、色谱、缓冲液交换或过滤的细胞裂解物。在一些实施例中,所述方法能够检测和/或滴定经纯化样品,例如已经从如本文所述的AAV生产细胞中纯化的样品中的AAV(例如,Anc80)。在一些实施例中,经纯化样品不含或基本上不含非AAV颗粒。

[0032] 色谱方法

[0033] 在一些实施例中,本公开提供了一种测定由生产细胞产生的AAV滴度的分析方法。在一些实施例中,所述方法用于测定在生产过程期间的不同点,例如在生产细胞生长期间和/或在本文所述的AAV分离和纯化过程期间的不同时间点处的AAV滴度。在一些实施例中,所述方法能够检测和/或滴定AAV而不裂解生产细胞。在一些实施例中,所述方法包括测量AAV衣壳滴度。

[0034] 在一些实施例中,本公开提供了一种测定细胞悬浮液或细胞裂解物中的腺相关病毒的衣壳滴度的方法,所述方法包括:(a)使所述细胞悬浮液或细胞裂解物经历高效液相色谱(HPLC),其中所述HPLC是用与所述腺相关病毒的病毒颗粒(VP)结合的树脂进行的;以及(b)检测所述细胞悬浮液或细胞裂解物中的所述VP,由此测定所述腺相关病毒的衣壳滴度。

[0035] 在各实施例中,本文所述的树脂能够与病毒颗粒的衣壳蛋白结合。

[0036] 在示例性实施例中,VP的检测通过分光光度法进行,包含例如通过使用吸光度测

量。用于在HPLC之后测量溶液的吸光度的装置是本领域熟知的,并且容易地被配置成用作HPLC设备的一部分或与HPLC柱分开使用。在各实施例中,腺相关病毒的VP的检测通过获得样品在约270-290nm,更适当地在约280nm或具体地在280nm处的吸光度而进行。然后可以将此测量值与校准曲线(手动地或作为仪器测量的一部分)进行比较,以提供样品中的一定量的病毒衣壳的输出。

[0037] 在一些实施例中,细胞悬浮液包括悬浮于生长培养基和/或缓冲液中的生产细胞。在一些实施例中,细胞裂解物是未纯化的细胞裂解物,即,在细胞裂解之后未经历任何下游纯化过程的细胞裂解物。在其它实施例中,细胞裂解物是部分纯化的细胞裂解物,例如,如本文所述,在细胞裂解之后已经经历一个或多个下游纯化过程的细胞裂解物。在一些实施例中,细胞裂解物包括一种或多种杂质,所述一种或多种杂质可以包含蛋白质、核酸、多糖、脂质或生产细胞的其它细胞组分。在一些实施例中,杂质包括不是经组装AAV颗粒的一部分的病毒组分。在一些实施例中,杂质包括部分组装的AAV颗粒。在一些实施例中,杂质包括错误折叠的病毒蛋白或畸形病毒颗粒。

[0038] 如本文所述,在各实施例中,AAV包括荧光部分。在一些实施例中,荧光部分是荧光染料。在一些实施例中,荧光部分掺入到AAV颗粒中,例如掺入到衣壳中。在其它实施例中,荧光部分掺入到AAV中的核酸中。在另外的实施例中,荧光部分掺入到AAV中的蛋白质或多肽中。在一些实施例中,荧光部分是荧光蛋白。在一些实施例中,AAV表达荧光蛋白。在一些实施例中,荧光蛋白是绿色荧光蛋白(GFP)、蓝色荧光蛋白(BFP)、红色荧光蛋白(RFP)、黄色荧光蛋白(YFP)、青色荧光蛋白(CFP)、mCherry、mApple、mTurquoise、mVenus、mK02、mKate2,或其任何变体或衍生物(例如,eGFP)。另外的荧光部分和标签是本领域已知的,并且包含例如红色荧光蛋白,如TagRFP、mKate2、mRuby2和Fusion Red,以及其它荧光蛋白,包含例如单体化(V206K) superfolder GFP、mTurquoise、Cerulean3、增强型蓝色FP 2 (EBFP2)、TagBFP、mNeonGreen和单体化Venus (A206K)等。在荧光部分或标签与腺相关病毒一起使用的实施例中,检测适当地包括荧光检测。用于这种荧光检测的装置是本领域已知的并且可以容易地与HPLC装置和设备组合。例如在Jensen,《解剖学记录(The Anatomical Record)》295(12): 2031-2036 (2012)中进一步描述了荧光部分。在一些实施例中,使用荧光,例如通过连接到HPLC的荧光检测器检测AAV。与在260nm和/或280nm处的吸光度的检测相比,例如VP的荧光检测具有更高灵敏度。与需要比率计算的A260/A280测量相比,荧光检测还可以提供简单且直接的输出。在一些实施例中,利用荧光检测或吸光度测量的本文所述的方法的检测限为约 10^6 个、约 10^7 个、约 10^8 个、约 10^9 个或约 10^{10} 个病毒颗粒。

[0039] 在一些实施例中,HPLC是用包含在体积为以下的柱中的树脂进行的:约0.1mL到约5.0mL、约0.1mL到约4.0mL、约0.1mL到约3.0mL、约0.1mL到约2.0mL、约0.1mL到约1.0mL、约0.1mL到约0.9mL、约0.2mL到约0.8mL、约0.3mL到约0.7mL或约0.4mL到约0.6mL。在一些实施例中,HPLC是用包含在体积为以下的柱中的树脂进行的:约0.1mL、约0.2mL、约0.3mL、约0.4mL、约0.5mL、约0.6mL、约0.7mL、约0.8mL、约0.9mL、约1.0mL、约1.5mL、约2.0mL、约2.5mL、约3.0mL、约3.5mL、约4.0mL、约4.5mL或约5.0mL。

[0040] 在一些实施例中,树脂是亲和树脂。适当地,树脂包括抗体或其变体,包含其抗原/表位结合部分、抗体片段或衍生物、抗体类似物、工程化抗体或以与抗体类似的方式与抗原结合的物质。在各实施例中,树脂包括抗体的至少一个重链或轻链互补决定区(CDR)。在一

些实施例中,树脂包括来自一种或多种抗体的至少两个CDR。在示例性实施例中,树脂包括抗体或其抗原结合片段。

[0041] 在一些实施例中,树脂与任何血清型或各种AAV血清型的腺相关病毒结合。如本文所述,AAV_x是指此类各种AAV血清型。在一些实施例中,树脂能够与以下中的任一个特异性结合:Anc80、Anc80L27、Anc80L65、Anc80L121、AAV1、AAV-2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、AAV16、AAV1.1、AAV2.5、AAV2i8、AAV2G9、AAV2tYF、AAV2-TT、AAV2-TT-S312N、AAV3B、AAV3B-S312N、AAV-LK3、AAV6.1、AAV6.3.1、AAV.7m8、AAV9.45、AAV.HSC1、AAV.HSC2、AAV.HSC3、AAV.HSC4、AAV.HSC5、AAV.HSC6、AAV.HSC7、AAV.HSC8、AAV.HSC9、AAV.HSC10、AAV.HSC11、AAV.HSC12、AAV.HSC13、AAV.HSC14、AAV.HSC15、AAV.HSC16、AAV.rh8、AAV.rh10、AAV.rh20、AAV.rh32、AAV.rh33、AAV.rh39、AAV.rh74、AAV.RHM4-1、AAV.RHM15-1、AAV.RHM15-2、AAV.RHM15-3、AAV.RHM15-4、AAV.RHM15-5、AAV.RHM15-6、AAV.cy10、AAV.dj、AAV.po4、AAV.po6、AAV.hu26、AAV.hu37、AAV.PHP.B、Anc126和Anc127。在合适的实施例中,AAV包括Anc80。在一些实施例中,树脂与AAV的病毒颗粒(VP)的衣壳蛋白结合。在各实施例中,树脂与经组装AAV颗粒结合,并且适当地,树脂与AAV衣壳上的构象表位结合。

[0042] 在一些实施例中,AAV滴度(例如,Anc80滴度)通过测量HPLC色谱图上的峰面积来测定。在示例性实施例中,所述方法进一步包括通过数字液滴PCR(ddPCR)测量AAV基因组滴度(例如,Anc80滴度)。在以下文献中描述了通过ddPCR进行的对病毒,例如AAV的滴定:Furuta-Hanawa等人,《人基因疗法方法(Hum.Gene Ther.Methods)》30(4):127-136(2019)。在一些实施例中,所述方法进一步包括基于通过HPLC和ddPCR测量的AAV滴度的结果测定细胞悬浮液或细胞裂解物中的全与空衣壳的比率。

[0043] 如本文所述,已经令人惊讶地发现,HPLC方法可以用于测定衣壳滴度或包含Anc80在内的AAV血清型,而不需要首先纯化细胞样品并且使用小样品大小(例如,数十至数百毫升的样品)。这允许在加工期间直接使用快速且简单的病毒滴度测定方法,从而允许关于下游加工的快速测定。

[0044] 本文所述的HPLC方法可以与任何生物反应器以及任何体积的生物反应器过程组合使用。示例性反应器包含但不限于搅拌罐、气升、纤维、微纤维、中空纤维、陶瓷基质、流化床、固定床和/或喷动床生物反应器。如本文所使用的,“反应器”可以包含发酵罐或发酵单元或任何其它反应容器,并且术语“反应器”与“发酵罐”可互换地使用。术语发酵罐或发酵是指微生物培养物和哺乳动物培养物两者。例如,在一些方面,示例生物反应器单元可以执行以下中的一项或多项或全部:营养物和/或碳源的进给、合适的气体(例如,氧气)的注射、发酵或细胞培养基的入口和出口流动、气相和液相的分离、温度的维持、氧气和CO₂水平的维持、pH水平的维持、搅动(例如,搅拌)和/或清洁/灭菌。示例反应器单元,如发酵单元可以含有在单元内的多个反应器,例如所述单元可以具有在每个单元中的1个、2个、3个、4个、5个、10个、15个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个、60个、70个、80个、90个或100个或更多个生物反应器和/或设施可以含有多个单元,所述多个单元具有在所述设施内的单个或多个反应器。在各个实施例中,生物反应器可以适用于分批、半补料分批、补料分批、灌注和/或连续发酵过程。可以使用任何合适的反应器直径。在各实施例中,生物反应器的体积可以介于约100mL与约50,000L之间。非限制性实例的体积为100mL、250mL、500mL、750mL、1

升、2升、3升、4升、5升、6升、7升、8升、9升、10升、15升、20升、25升、30升、40升、50升、60升、70升、80升、90升、100升、150升、200升、250升、300升、350升、400升、450升、500升、550升、600升、650升、700升、750升、800升、850升、900升、950升、1000升、1500升、2000升、2500升、3000升、3500升、4000升、4500升、5000升、6000升、7000升、8000升、9000升、10,000升、15,000升、20,000升和/或50,000升。另外,合适的反应器可以是多次使用的、单次使用的、一次性的或非一次性的,并且可以由任何合适的材料形成,包含金属合金,如不锈钢(例如,316L或任何其它合适的不锈钢)和Inconel、塑料和/或玻璃。

[0045] 免疫测定方法

[0046] 在一些实施例中,本公开提供了一种用于检测和/或滴定样品中的腺相关病毒(AAV)的免疫测定方法。在一些实施例中,所述方法用于测定在生产过程期间的不同点,例如在生产细胞生长期间和/或在本文所述的AAV分离和纯化过程期间的不同时间点处的AAV滴度。在一些实施例中,所述方法能够检测和/或滴定AAV而不裂解生产细胞。在一些实施例中,所述方法包括测量AAV衣壳滴度。

[0047] 在一些实施例中,所述方法是用于检测和/或滴定样品中的AAV(例如,Anc80)的免疫测定(例如,酶联免疫吸附测定或ELISA)。免疫测定提供许多优点,如高特异性和灵敏度,并且还可以以高通量格式进行以在一个实验中评估多个样品。在一些实施例中,免疫测定能够使用相同的捕获和/或检测试剂检测和/或滴定多种AAV血清型。例如,免疫测定可以在多孔板中进行,并且每个孔(或每组孔)可以对应于不同的AAV血清型。

[0048] 在一些实施例中,样品是细胞悬浮液,即,包括悬浮于生长培养基和/或缓冲液中的生产细胞。在一些实施例中,样品是未纯化的细胞裂解物,即,在细胞裂解之后未经历任何纯化过程的细胞裂解物。在一些实施例中,样品是部分纯化的细胞裂解物,例如,如本文所述,在细胞裂解之后已经经历一个或多个纯化过程的细胞裂解物。在一些实施例中,样品包括一种或多种杂质。在一些实施例中,杂质包括蛋白质、核酸、多糖、脂质或生产细胞的其它细胞组分。在各实施例中,杂质包括不是经组装AAV颗粒的一部分的病毒组分。在其它实施例中,杂质包括部分组装的AAV颗粒。在一些实施例中,杂质包括错误折叠的病毒蛋白或畸形病毒颗粒。

[0049] 在示例性实施例中,本公开提供了一种用于检测样品中的腺相关病毒(AAV)的方法,所述方法包括:(a)使所述样品与以下接触:(i)捕获试剂,所述捕获试剂与腺相关病毒(AAVx)结合;以及(ii)检测试剂,所述检测试剂与腺相关病毒(AAVx)结合;(b)形成包括所述捕获试剂、所述AAV和所述检测试剂的结合复合物;以及(c)检测所述结合复合物,由此检测所述样品中的所述AAV。

[0050] 在一些实施例中,AAV是本文提供的血清型中的任何血清型。在一些实施例中,AAV是Anc80、Anc80L27、Anc80L65、Anc80L121、AAV1、AAV-2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、AAV16、AAV1.1、AAV2.5、AAV2i8、AAV2G9、AAV2tYF、AAV2-TT、AAV2-TT-S312N、AAV3B、AAV3B-S312N、AAV-LK3、AAV6.1、AAV6.3.1、AAV.7m8、AAV9.45、AAV.HSC1、AAV.HSC2、AAV.HSC3、AAV.HSC4、AAV.HSC5、AAV.HSC6、AAV.HSC7、AAV.HSC8、AAV.HSC9、AAV.HSC10、AAV.HSC11、AAV.HSC12、AAV.HSC13、AAV.HSC14、AAV.HSC15、AAV.HSC16、AAV.rh8、AAV.rh10、AAV.rh20、AAV.rh32、AAV.rh33、AAV.rh39、AAV.rh74、AAV.RHM4-1、AAV.RHM15-1、AAV.RHM15-2、AAV.RHM15-3、AAV.RHM15-4、

AAV.RHM15-5、AAV.RHM15-6、AAV.cy10、AAV.dj、AAV.po4、AAV.po6、AAV.hu26、AAV.hu37、AAV.PHP.B、Anc126、Anc127或其组合。在一些实施例中，AAV是Anc80。

[0051] 在另外的实施例中，本公开提供了一种用于检测样品中的腺相关病毒血清型Anc80的方法，所述方法包括：(a) 使所述样品与以下接触：(i) 捕获试剂，所述捕获试剂与腺相关病毒(AAVx)或腺相关病毒血清型8(AAV8)结合；以及(ii) 检测试剂，所述检测试剂与腺相关病毒(AAVx)或腺相关病毒血清型8(AAV8)结合；(b) 形成包括所述捕获试剂、所述Anc80和所述检测试剂的结合复合物；以及(c) 检测所述结合复合物，由此检测所述样品中的所述Anc80。

[0052] Anc80是AAV血清型1、2、8和9的预测祖先，并且作为有效的基因疗法载体由Zinn等人重建(参见Zinn等人，《细胞报告(Cell Reports)》12:1056-1068(2015)和Landegger等人，《自然生物技术(Nature Biotechnol.)》35:280-284(2017))。Anc80克隆包含例如Anc80L27、Anc80L65、Anc80L121。在一些实施例中，本文提供的方法能够检测Anc80L27、Anc80L65和Anc80L121。

[0053] 捕获和检测试剂

[0054] 在一些实施例中，捕获试剂是抗体或其变体，包含其抗原/表位结合部分、抗体片段或衍生物、抗体类似物、工程化抗体或以与抗体类似的方式与抗原结合的物质。在一些实施例中，捕获试剂包括抗体的至少一个重链或轻链互补决定区(CDR)。在一些实施例中，捕获试剂包括来自一种或多种抗体的至少两个CDR。在一些实施例中，捕获试剂是抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中，捕获试剂是单克隆抗体。

[0055] 在示例性实施例中，捕获试剂固定在表面上。合适的表面包含例如颗粒(如，珠粒)，包含由此类颗粒制备的柱，以及如多孔板等塑料基板。在一些实施例中，表面包括多孔板，并且捕获试剂固定在多孔板的孔中。在一些实施例中，表面包括颗粒，并且捕获试剂固定在颗粒上。在一些实施例中，捕获试剂包括能够与表面上的其对应缀合配偶体反应的缀合部分。示例性缀合部分-缀合配偶体对包含但不限于受体-配体对、互补寡核苷酸或交叉反应性部分，例如硫醇和马来酰亚胺或碘乙酰胺；醛和酰肼；或叠氮化物和炔或环炔。在一些实施例中，捕获试剂包括生物素，并且表面包括亲和素或链霉亲和素。

[0056] 在一些实施例中，捕获试剂与任何血清型的腺相关病毒(AAVx)结合。在一些实施例中，捕获试剂能够与以下中的任一个特异性结合：Anc80、Anc80L27、Anc80L65、Anc80L121、AAV1、AAV-2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、AAV16、AAV1.1、AAV2.5、AAV2i8、AAV2G9、AAV2tYF、AAV2-TT、AAV2-TT-S312N、AAV3B、AAV3B-S312N、AAV-LK3、AAV6.1、AAV6.3.1、AAV.7m8、AAV9.45、AAV.HSC1、AAV.HSC2、AAV.HSC3、AAV.HSC4、AAV.HSC5、AAV.HSC6、AAV.HSC7、AAV.HSC8、AAV.HSC9、AAV.HSC10、AAV.HSC11、AAV.HSC12、AAV.HSC13、AAV.HSC14、AAV.HSC15、AAV.HSC16、AAV.rh8、AAV.rh10、AAV.rh20、AAV.rh32、AAV.rh33、AAV.rh39、AAV.rh74、AAV.RHM4-1、AAV.RHM15-1、AAV.RHM15-2、AAV.RHM15-3、AAV.RHM15-4、AAV.RHM15-5、AAV.RHM15-6、AAV.cy10、AAV.dj、AAV.po4、AAV.po6、AAV.hu26、AAV.hu37、AAV.PHP.B、Anc126和Anc127。在一些实施例中，捕获试剂与Anc80结合。在各实施例中，捕获试剂与Anc80的衣壳蛋白(VP)结合。在一些实施例中，捕获试剂与经组装AAV颗粒结合。在一些实施例中，捕获试剂与AAV衣壳上的构象表位结合。

[0057] 在另外的实施例中,捕获试剂与AAV8结合。在一些实施例中,捕获试剂能够与AAV8和Anc80结合。

[0058] 在一些实施例中,捕获试剂与AAV8的病毒颗粒(VP)的衣壳蛋白或Anc80的蛋白质结合。适当地,捕获试剂与AAV8的VP3蛋白或VP3蛋白Anc80结合。在各实施例中,捕获试剂与AAV8的VP3或Anc80的VP3蛋白的残基575-610内或残基580-600内或残基580-595内的表位结合。在合适的实施例中,捕获试剂与AAV8 VP3蛋白的残基586-591内的表位结合。在其它实施例中,捕获试剂与Anc80 VP3蛋白的残基589-594内的表位结合。在一些实施例中,捕获试剂与序列LQSANT (SEQ ID NO:1) 结合。在其它实施例中,捕获试剂与序列LQQQNT (SEQ ID NO:2) 结合。在一些实施例中,捕获试剂是AAV8抗体克隆ADK8。

[0059] 适当地,检测试剂是抗体或其变体,包含其抗原/表位结合部分、抗体片段或衍生物、抗体类似物、工程化抗体或以与抗体类似的方式与抗原结合的物质。在一些实施例中,检测试剂包括抗体的至少一个重链或轻链互补决定区(CDR)。在一些实施例中,检测试剂包括来自一种或多种抗体的至少两个CDR。在示例性实施例中,检测试剂是抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,检测试剂是单克隆抗体。

[0060] 适当地,检测试剂与任何血清型的腺相关病毒(AAVx) 结合。在一些实施例中,检测试剂能够与以下中的任一个结合:Anc80、Anc80L27、Anc80L65、Anc80L121、AAV1、AAV-2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、AAV16、AAV1.1、AAV2.5、AAV2i8、AAV2G9、AAV2tYF、AAV2-TT、AAV2-TT-S312N、AAV3B、AAV3B-S312N、AAV-LK3、AAV6.1、AAV6.3.1、AAV.7m8、AAV9.45、AAV.HSC1、AAV.HSC2、AAV.HSC3、AAV.HSC4、AAV.HSC5、AAV.HSC6、AAV.HSC7、AAV.HSC8、AAV.HSC9、AAV.HSC10、AAV.HSC11、AAV.HSC12、AAV.HSC13、AAV.HSC14、AAV.HSC15、AAV.HSC16、AAV.rh8、AAV.rh10、AAV.rh20、AAV.rh32、AAV.rh33、AAV.rh39、AAV.rh74、AAV.RHM4-1、AAV.RHM15-1、AAV.RHM15-2、AAV.RHM15-3、AAV.RHM15-4、AAV.RHM15-5、AAV.RHM15-6、AAV.cy10、AAV.dj、AAV.po4、AAV.po6、AAV.hu26、AAV.hu37、AAV.PHP.B、Anc126和Anc127。在一些实施例中,检测试剂与Anc80结合。在一些实施例中,检测试剂与Anc80的VP的衣壳蛋白结合。在一些实施例中,检测试剂与经组装AAV颗粒结合。在一些实施例中,检测试剂与AAV衣壳上的构象表位结合。

[0061] 在另外的实施例中,检测试剂与AAV8结合。在一些实施例中,检测试剂能够与AAV8和Anc80结合。在各实施例中,检测试剂与AAV8的病毒颗粒(VP)的衣壳蛋白或Anc80的蛋白质结合,并且适当地,检测试剂与AAV8的VP3蛋白或VP3蛋白Anc80结合。在一些实施例中,检测试剂与AAV8的VP3或Anc80的VP3蛋白的残基575-610内或残基580-600内或残基580-595内的表位结合。在一些实施例中,检测试剂与AAV8 VP3蛋白的残基586-591内的表位结合。在一些实施例中,检测试剂与Anc80 VP3蛋白的残基589-594内的表位结合。在一些实施例中,检测试剂与序列LQSANT (SEQ ID NO:1) 结合。在一些实施例中,检测试剂与序列LQQQNT (SEQ ID NO:2) 结合。在一些实施例中,检测试剂是AAV8抗体克隆ADK8。

[0062] 在另外的实施例中,捕获试剂与AAV8结合,并且检测试剂与AAVx结合。在一些实施例中,捕获试剂与AAVx结合,并且检测试剂与AAV8结合。在一些实施例中,捕获试剂和检测试剂两者均与AAVx结合。在示例性实施例中,捕获试剂和检测试剂两者均能够与以下中的任一个结合:Anc80、Anc80L27、Anc80L65、Anc80L121、AAV1、AAV-2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、AAV16、AAV1.1、AAV2.5、

AAV2i8、AAV2G9、AAV2tYF、AAV2-TT、AAV2-TT-S312N、AAV3B、AAV3B-S312N、AAV-LK3、AAV6.1、AAV6.3.1、AAV.7m8、AAV9.45、AAV.HSC1、AAV.HSC2、AAV.HSC3、AAV.HSC4、AAV.HSC5、AAV.HSC6、AAV.HSC7、AAV.HSC8、AAV.HSC9、AAV.HSC10、AAV.HSC11、AAV.HSC12、AAV.HSC13、AAV.HSC14、AAV.HSC15、AAV.HSC16、AAV.rh8、AAV.rh10、AAV.rh20、AAV.rh32、AAV.rh33、AAV.rh39、AAV.rh74、AAV.RHM4-1、AAV.RHM15-1、AAV.RHM15-2、AAV.RHM15-3、AAV.RHM15-4、AAV.RHM15-5、AAV.RHM15-6、AAV.cy10、AAV.dj、AAV.po4、AAV.po6、AAV.hu26、AAV.hu37、AAV.PHP.B、Anc126和Anc127。

[0063] 结合复合物形成

[0064] 在一些实施例中,包括捕获试剂、AAV(例如,Anc80)和检测试剂的结合复合物在单个步骤中形成。在其它实施例中,包括捕获试剂、AAV(例如,Anc80)和检测试剂的结合复合物在一个或多个步骤中形成。在一些实施例中,结合复合物在溶液中形成,然后固定到表面。在一些实施例中,结合复合物是通过将AAV(例如,Anc80)与固定在表面上的捕获试剂结合,然后将检测试剂与AAV(例如,Anc80)结合以在表面上形成结合复合物而形成的。在一些实施例中,结合复合物是通过将AAV(例如,Anc80)与固定在表面上的捕获试剂结合并且同时与检测试剂结合而形成的。在其它实施例中,结合复合物是通过将AAV(例如,Anc80)与溶液中的检测试剂结合,然后将AAV检测试剂复合物与表面上的捕获试剂结合而形成的。在另外的实施例中,结合复合物是通过将AAV(例如,Anc80)与溶液中的捕获试剂和检测试剂结合,然后将捕获试剂固定到如本文所述的表面而形成的。

[0065] 检测

[0066] 在各实施例中,通过可检测部分检测结合复合物。例如,可检测部分通过分光光度法(颜色变化)、光散射、光学吸光度、荧光、化学发光、电化学发光、生物发光、磷光、放射性、磁场或其组合来测量。在各实施例中,AAV滴度(例如,Anc80滴度)通过测量可检测部分来测定。在一些实施例中,可检测部分在存在底物的情况下是可检测的。适当地,可检测部分是裂解底物的酶,并且检测包括检测经裂解的底物。在一些实施例中,可检测部分包括辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(AP)、葡萄糖氧化酶(GO)或 β 半乳糖苷酶(BGAL或 β -gal)。HRP底物的非限制性实例包含例如,3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、3,3'-二氨基联苯胺(DAB)、2,2'-次偶氮基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)、邻苯二胺二盐酸盐(OPD)、AMPLEX®Red;3-氨基-9-乙基呋唑(AEC)、高香草酸、鲁米诺以及来自赛默飞世尔公司(ThermoFisher)的SUPERSIGNAL™ELISA、QUANTABLU™和QUANTARED™底物。AP底物的非限制性实例包含例如磷酸对硝基苯酯(PNPP)以及来自赛默飞世尔公司的CDP-STAR™和DYNALIGHT™底物。GO底物包含例如葡萄糖。BGAL底物包含例如邻硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(ONPG)。

[0067] 在一些实施例中,检测试剂包括可检测部分,并且检测结合复合物包括测量检测试剂的可检测部分。在各实施例中,检测试剂包括可检测部分的结合配偶体,并且检测结合复合物包括使检测试剂与可检测部分接触以及测量与检测试剂结合的可检测部分。在另外的实施例中,检测试剂和可检测部分各自包括结合对中的结合配偶体。本领域已知的合适的结合对可以包含但不限于受体-配体对、互补寡核苷酸或交叉反应性部分,例如硫醇和马来酰亚胺或碘乙酰胺;醛和肼;或叠氮化物和炔或环炔。在一些实施例中,检测试剂包括生物素,并且可检测部分包括亲和素或链霉亲和素。在一些实施例中,检测试剂包括生物

素,并且可检测部分包括与亲和素或链霉亲和素缀合的辣根过氧化物酶(HRP)。适当地,检测结合复合物包括:将结合复合物与HRP结合(例如,通过检测试剂和HRP上的生物素-亲和素或链霉亲和素相互作用),使HRP与生色或化学发光的HRP底物接触,以及检测颜色或化学发光信号的变化。在一些实施例中,AAV滴度(例如,Anc80滴度)通过测量颜色和/或化学发光信号的变化来测定。

[0068] 试剂盒

[0069] 在一些实施例中,本公开提供一种用于进行本文所述的方法的试剂盒,例如免疫测定试剂盒。在一些实施例中,本公开提供了一种用于检测和/或滴定腺相关病毒(AAV)的试剂盒,所述试剂盒包括:(a)捕获试剂,所述捕获试剂与腺相关病毒(AAVx)结合;以及(b)检测试剂,所述检测试剂与腺相关病毒(AAVx)结合。本文所述的试剂盒还适当地包含用于实施本文所述的各种方法,包含基于ELISA的方法的说明书。

[0070] 在一些实施例中,试剂盒用于检测和/或滴定本文所述的任何AAV血清型,例如,Anc80、Anc80L27、Anc80L65、Anc80L121、AAV1、AAV-2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、AAV16、AAV1.1、AAV2.5、AAV2i8、AAV2G9、AAV2tYF、AAV2-TT、AAV2-TT-S312N、AAV3B、AAV3B-S312N、AAV-LK3、AAV6.1、AAV6.3.1、AAV.7m8、AAV9.45、AAV.HSC1、AAV.HSC2、AAV.HSC3、AAV.HSC4、AAV.HSC5、AAV.HSC6、AAV.HSC7、AAV.HSC8、AAV.HSC9、AAV.HSC10、AAV.HSC11、AAV.HSC12、AAV.HSC13、AAV.HSC14、AAV.HSC15、AAV.HSC16、AAV.rh8、AAV.rh10、AAV.rh20、AAV.rh32、AAV.rh33、AAV.rh39、AAV.rh74、AAV.RHM4-1、AAV.RHM15-1、AAV.RHM15-2、AAV.RHM15-3、AAV.RHM15-4、AAV.RHM15-5、AAV.RHM15-6、AAV.cy10、AAV.dj、AAV.po4、AAV.po6、AAV.hu26、AAV.hu37、AAV.PHP.B、Anc126或Anc127。在一些实施例中,AAV是Anc80。本文进一步描述了Anc80。

[0071] 在一些实施例中,本公开提供了一种试剂盒,其包括:(a)捕获试剂,所述捕获试剂与腺相关病毒(AAVx)或腺相关病毒血清型8(AAV8)结合;以及(b)检测试剂,所述检测试剂与腺相关病毒(AAVx)或腺相关病毒血清型8(AAV8)结合。

[0072] 本文进一步描述了捕获试剂和检测试剂。在一些实施例中,捕获试剂是抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,检测试剂是抗体或其抗原结合片段。

[0073] 在一些实施例中,试剂盒包括捕获表面。捕获表面可以是本文所述的表面中的任何表面。在一些实施例中,捕获表面包括颗粒。在一些实施例中,捕获表面包括塑料基板,如多孔板。在一些实施例中,捕获试剂固定在捕获表面上。在一些实施例中,捕获表面是多孔板,并且捕获试剂固定在多孔板的孔上。

[0074] 在一些实施例中,捕获试剂和捕获表面分开提供,并且试剂盒进一步包括用于将捕获试剂固定到捕获表面的试剂。在一些实施例中,捕获试剂包括缀合部分,并且捕获表面包括其缀合配偶体。示例性缀合部分-缀合配偶体对包含但不限于受体-配体对、互补寡核苷酸或交叉反应性部分,例如硫醇和马来酰亚胺或碘乙酰胺;醛和酰肼;或叠氮化物和炔或环炔。在一些实施例中,捕获试剂包括生物素,并且捕获表面包括与其连接的亲和素或链霉亲和素。

[0075] 在一些实施例中,捕获试剂与任何血清型的腺相关病毒(AAVx)结合。在一些实施例中,捕获试剂能够与以下中的任一个特异性结合:Anc80、Anc80L27、Anc80L65、Anc80L121、AAV1、AAV-2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、

AAV13、AAV14、AAV15、AAV16、AAV1.1、AAV2.5、AAV2i8、AAV2G9、AAV2tYF、AAV2-TT、AAV2-TT-S312N、AAV3B、AAV3B-S312N、AAV-LK3、AAV6.1、AAV6.3.1、AAV.7m8、AAV9.45、AAV.HSC1、AAV.HSC2、AAV.HSC3、AAV.HSC4、AAV.HSC5、AAV.HSC6、AAV.HSC7、AAV.HSC8、AAV.HSC9、AAV.HSC10、AAV.HSC11、AAV.HSC12、AAV.HSC13、AAV.HSC14、AAV.HSC15、AAV.HSC16、AAV.rh8、AAV.rh10、AAV.rh20、AAV.rh32、AAV.rh33、AAV.rh39、AAV.rh74、AAV.RHM4-1、AAV.RHM15-1、AAV.RHM15-2、AAV.RHM15-3、AAV.RHM15-4、AAV.RHM15-5、AAV.RHM15-6、AAV.cy10、AAV.dj、AAV.po4、AAV.po6、AAV.hu26、AAV.hu37、AAV.PHP.B、Anc126和Anc127。在一些实施例中，捕获试剂与Anc80结合。在一些实施例中，捕获试剂与Anc80的衣壳蛋白(VP)结合。在一些实施例中，捕获试剂与经组装AAV颗粒结合。在一些实施例中，捕获试剂与AAV衣壳上的构象表位结合。

[0076] 在一些实施例中，捕获试剂与AAV8结合。在一些实施例中，捕获试剂能够与AAV8和Anc80结合。在一些实施例中，捕获试剂与AAV8的病毒颗粒(VP)的衣壳蛋白或Anc80的衣壳蛋白结合。在一些实施例中，捕获试剂与AAV8的VP3蛋白或VP3蛋白Anc80结合。在一些实施例中，捕获试剂与AAV8的VP3或Anc80的VP3蛋白的残基575-610内或残基580-600内或残基580-595内的表位结合。在一些实施例中，捕获试剂与AAV8 VP3蛋白的残基586-591内的表位结合。在一些实施例中，捕获试剂与Anc80 VP3蛋白的残基589-594内的表位结合。在一些实施例中，捕获试剂与序列LQSANT(SEQ ID NO:1)结合。在一些实施例中，捕获试剂与序列LQQQNT(SEQ ID NO:2)结合。在一些实施例中，捕获试剂是AAV8抗体克隆ADK8。

[0077] 在一些实施例中，检测试剂与任何血清型的腺相关病毒(AAVx)结合。在一些实施例中，检测试剂能够与以下中的任一个结合：Anc80、Anc80L27、Anc80L65、Anc80L121、AAV1、AAV-2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、AAV16、AAV1.1、AAV2.5、AAV2i8、AAV2G9、AAV2tYF、AAV2-TT、AAV2-TT-S312N、AAV3B、AAV3B-S312N、AAV-LK3、AAV6.1、AAV6.3.1、AAV.7m8、AAV9.45、AAV.HSC1、AAV.HSC2、AAV.HSC3、AAV.HSC4、AAV.HSC5、AAV.HSC6、AAV.HSC7、AAV.HSC8、AAV.HSC9、AAV.HSC10、AAV.HSC11、AAV.HSC12、AAV.HSC13、AAV.HSC14、AAV.HSC15、AAV.HSC16、AAV.rh8、AAV.rh10、AAV.rh20、AAV.rh32、AAV.rh33、AAV.rh39、AAV.rh74、AAV.RHM4-1、AAV.RHM15-1、AAV.RHM15-2、AAV.RHM15-3、AAV.RHM15-4、AAV.RHM15-5、AAV.RHM15-6、AAV.cy10、AAV.dj、AAV.po4、AAV.po6、AAV.hu26、AAV.hu37、AAV.PHP.B、Anc126和Anc127。在一些实施例中，检测试剂与Anc80结合。在一些实施例中，检测试剂与Anc80的衣壳蛋白(VP)结合。在一些实施例中，检测试剂与经组装AAV颗粒结合。在一些实施例中，检测试剂与AAV衣壳上的构象表位结合。

[0078] 在一些实施例中，检测试剂与AAV8结合。在一些实施例中，检测试剂能够与AAV8和Anc80结合。在一些实施例中，检测试剂与AAV8的病毒颗粒(VP)的衣壳蛋白或Anc80的衣壳蛋白结合。在一些实施例中，检测试剂与AAV8的VP3蛋白或VP3蛋白Anc80结合。在一些实施例中，检测试剂与AAV8的VP3或Anc80的VP3蛋白的残基575-610内或残基580-600内或残基580-595内的表位结合。在一些实施例中，检测试剂与AAV8 VP3蛋白的残基586-591内的表位结合。在一些实施例中，检测试剂与Anc80 VP3蛋白的残基589-594内的表位结合。在一些实施例中，检测试剂与序列LQSANT(SEQ ID NO:1)结合。在一些实施例中，检测试剂与序列LQQQNT(SEQ ID NO:2)结合。在一些实施例中，检测试剂是AAV8抗体克隆ADK8。

[0079] 在一些实施例中，捕获试剂与AAV8结合，并且检测试剂与AAVx结合。在一些实施例

中,捕获试剂与AAV_x结合,并且检测试剂与AAV8结合。在一些实施例中,捕获试剂和检测试剂两者均与AAV_x结合。在一些实施例中,捕获试剂和检测试剂两者均能够与以下中的任一个结合:Anc80、Anc80L27、Anc80L65、Anc80L121、AAV1、AAV-2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、AAV16、AAV1.1、AAV2.5、AAV2i8、AAV2G9、AAV2tYF、AAV2-TT、AAV2-TT-S312N、AAV3B、AAV3B-S312N、AAV-LK3、AAV6.1、AAV6.3.1、AAV.7m8、AAV9.45、AAV.HSC1、AAV.HSC2、AAV.HSC3、AAV.HSC4、AAV.HSC5、AAV.HSC6、AAV.HSC7、AAV.HSC8、AAV.HSC9、AAV.HSC10、AAV.HSC11、AAV.HSC12、AAV.HSC13、AAV.HSC14、AAV.HSC15、AAV.HSC16、AAV.rh8、AAV.rh10、AAV.rh20、AAV.rh32、AAV.rh33、AAV.rh39、AAV.rh74、AAV.RHM4-1、AAV.RHM15-1、AAV.RHM15-2、AAV.RHM15-3、AAV.RHM15-4、AAV.RHM15-5、AAV.RHM15-6、AAV.cy10、AAV.dj、AAV.po4、AAV.po6、AAV.hu26、AAV.hu37、AAV.PHP.B、Anc126和Anc127。

[0080] 在一些实施例中,检测试剂包括例如能够通过分光光度法(颜色变化)、光散射、光学吸光度、荧光、化学发光、电化学发光、生物发光、磷光、放射性、磁场或其组合来测量的可检测部分。在一些实施例中,检测试剂包括可检测部分的结合配偶体。在一些实施例中,检测试剂和可检测部分各自包括结合对中的结合配偶体,例如受体-配体对、互补寡核苷酸或交叉反应性部分,例如硫醇和马来酰亚胺或碘乙酰胺;醛和肟;或叠氮化物 and 炔或环炔。在一些实施例中,检测试剂包括生物素,并且可检测部分包括亲和素或链霉亲和素。在一些实施例中,可检测部分包括辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(AP)、葡萄糖氧化酶(GO)或β半乳糖苷酶(BGAL或β-gal)。在一些实施例中,检测试剂包括生物素,并且可检测部分包括与亲和素或链霉亲和素缀合的HRP。

[0081] 在一些实施例中,捕获试剂是冻干的。在一些实施例中,捕获试剂以溶液形式提供。在一些实施例中,检测试剂是冻干的。在一些实施例中,检测试剂以溶液形式提供。在捕获和/或检测试剂是冻干的各实施例中,试剂盒进一步适当地包括用于重构或再悬浮冻干试剂的缓冲液。在一些实施例中,捕获和/或检测试剂与试剂盒的其它组分分开提供,例如,根据其最佳运输和/或储存温度。

[0082] 在一些实施例中,试剂盒进一步包括以下中的一种或多种:缓冲液、测定终止溶液、校准试剂、能够与检测试剂结合的可检测部分和可检测底物。

[0083] 在一些实施例中,试剂盒包括以下中的一种或多种:测定缓冲液、封闭缓冲液、包被缓冲液、洗涤缓冲液、重构或再悬浮缓冲液和储存缓冲液。在一些实施例中,测定缓冲液包括磷酸盐缓冲盐水、碳酸钠、碳酸氢钠、Tris、NaCl、TWEEN或其组合。在一些实施例中,试剂盒包括测定终止溶液。在一些实施例中,测定终止溶液包括硫酸。

[0084] 在一些实施例中,试剂盒包括校准试剂。在一些实施例中,校准试剂包括已知量的AAV(例如,Anc80)。在一些实施例中,试剂盒包括多种校准试剂,所述多种校准试剂包括一系列浓度的AAV(例如,Anc80)。在一些实施例中,多种校准试剂的AAV(例如,Anc80)浓度接近用于使用试剂盒进行的方法的定量上限和下限。在一些实施例中,校准试剂的多个校准浓度跨越方法的整个动态范围。在一些实施例中,多种校准试剂包括多种AAV血清型,例如以校准用于检测不同AAV血清型的方法。在一些实施例中,校准试剂是阳性对照试剂。在一些实施例中,校准试剂是阴性对照试剂。在一些实施例中,校准试剂是冻干的。在一些实施例中,校准试剂以溶液形式提供。

[0085] 在一些实施例中,试剂盒包括能够与检测试剂结合的可检测部分。本文进一步描述了可检测部分。在一些实施例中,可检测部分包括辣根过氧化物酶 (HRP)、碱性磷酸酶 (AP)、葡萄糖氧化酶 (GO) 或 β 半乳糖苷酶 (BGAL或 β -gal)。在一些实施例中,试剂盒进一步包括用于可检测部分的底物。本文提供了用于可检测部分的示例性底物。在一些实施例中,底物是3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB)、3,3'-二氨基联苯胺 (DAB)、2,2'-次偶氮基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) (ABTS)、邻苯二胺二盐酸盐 (OPD)、AMPLEX®Red;3-氨基-9-乙基咔唑 (AEC)、高香草酸、鲁米诺以及来自赛默飞世尔公司的SUPERSIGNAL™ELISA、QUANTABLU™和QUANTARED™底物。在一些实施例中,底物是磷酸对硝基苯酯 (PNPP) 以及来自赛默飞世尔公司的CDP-STAR™和DYNALIGHT™底物。在一些实施例中,底物是葡萄糖。在一些实施例中,底物是邻硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷 (ONPG)。

[0086] 在一些实施例中,试剂盒进一步包括一个或多个测定消耗品,例如,测定模块、小瓶、试管、液体处理和转移装置,如移液管吸头、盖子以及密封件、架子和标签。在一些实施例中,试剂盒进一步包括用于进行免疫测定以检测和/或滴定AAV (例如,Anc80) 的说明书。在一些实施例中,免疫测定包括本文所述的方法。

[0087] 示例性实施例

[0088] 实施例1是一种用于检测样品中的腺相关病毒血清型Anc80的方法,所述方法包括:使所述样品与以下接触:(i) 捕获试剂,所述捕获试剂与腺相关病毒 (AAVx) 或腺相关病毒血清型8 (AAV8) 结合;以及(ii) 检测试剂,所述检测试剂与腺相关病毒 (AAVx) 结合;形成包括所述捕获试剂、所述Anc80和所述检测试剂的结合复合物;以及检测所述结合复合物,由此检测所述样品中的所述Anc80。

[0089] 实施例2包含根据实施例1所述的方法,其中所述捕获试剂和/或所述检测试剂是抗体或其抗原结合片段。

[0090] 实施例3包含根据实施例1或2所述的方法,其中所述捕获试剂固定在表面上。

[0091] 实施例4包含根据实施例3所述的方法,其中所述捕获试剂包括生物素,并且所述表面包括亲和素或链霉亲和素。

[0092] 实施例5包含根据实施例3或4所述的方法,其中所述表面是多孔板,并且所述捕获试剂固定在所述多孔板的孔中。

[0093] 实施例6包含根据实施例1到5中任一项所述的方法,其中所述捕获试剂与AAVx结合。

[0094] 实施例7包含根据实施例1到5中任一项所述的方法,其中所述捕获试剂与AAV8结合。

[0095] 实施例8包含根据实施例1到7中任一项所述的方法,其中所述捕获试剂与所述Anc80的病毒颗粒 (VP) 结合。

[0096] 实施例9包含根据实施例7所述的方法,其中所述捕获试剂与VP3结合。

[0097] 实施例10包含根据实施例9所述的方法,其中所述捕获试剂与VP3的残基580到600内的表位结合。

[0098] 实施例11包含根据实施例10所述的方法,其中所述捕获试剂与LQSANT (SEQ ID NO:1) 结合。

[0099] 实施例12包含根据实施例1到11中任一项所述的方法,其中所述检测试剂与AAVx

结合。

[0100] 实施例13包含根据实施例1到11中任一项所述的方法,其中所述检测试剂与AAV8结合。

[0101] 实施例14包含根据实施例1到13中任一项所述的方法,其中所述检测试剂与所述Anc80的病毒蛋白 (VP) 结合。

[0102] 实施例15包含根据实施例1到14中任一项所述的方法,其中所述检测试剂包括可检测部分的结合配偶体。

[0103] 实施例16包含根据实施例15所述的方法,其中所述检测试剂包括生物素,并且所述可检测部分包括与亲和素或链霉亲和素缀合的辣根过氧化物酶。

[0104] 实施例17包含根据实施例1所述的方法,其中所述捕获试剂与AAV8结合,并且所述检测试剂与AAVx结合。

[0105] 实施例18是一种试剂盒,其包括:捕获试剂,所述捕获试剂与腺相关病毒 (AAVx) 或腺相关病毒血清型8 (AAV8) 结合;以及检测试剂,所述检测试剂与腺相关病毒 (AAVx) 结合。

[0106] 实施例19包含根据实施例18所述的试剂盒,其中所述捕获试剂和/或所述检测试剂是抗体或其抗原结合片段。

[0107] 实施例20包含根据实施例18或19所述的试剂盒,其进一步包括捕获表面。

[0108] 实施例21包含根据实施例20所述的试剂盒,其中所述捕获试剂包括生物素,并且所述捕获表面包括与其连接的亲和素或链霉亲和素。

[0109] 实施例22包含根据实施例20或21所述的试剂盒,其中所述捕获表面是多孔板,并且所述捕获试剂固定在所述多孔板的孔上。

[0110] 实施例23包含根据实施例18到22中任一项所述的试剂盒,其中所述捕获试剂与AAVx结合。

[0111] 实施例24包含根据实施例18到22中任一项所述的试剂盒,其中所述捕获试剂与AAV8结合。

[0112] 实施例25包含根据实施例18到24中任一项所述的试剂盒,其中所述捕获试剂与所述Anc80的病毒蛋白 (VP) 结合。

[0113] 实施例26包含根据实施例24所述的试剂盒,其中所述捕获试剂与VP3结合。

[0114] 实施例27包含根据实施例26所述的试剂盒,其中所述捕获试剂与VP3的残基580到600内的表位结合。

[0115] 实施例28包含根据实施例27所述的试剂盒,其中所述捕获试剂与LQSANT (SEQ ID NO:1) 结合。

[0116] 实施例29包含根据实施例18到28中任一项所述的试剂盒,其中所述检测试剂与AAVx结合。

[0117] 实施例30包含根据实施例18到28中任一项所述的试剂盒,其中所述检测试剂与AAV8结合。

[0118] 实施例31包含根据实施例18到30中任一项所述的试剂盒,其中所述检测试剂与所述Anc80的衣壳蛋白 (VP) 结合。

[0119] 实施例32包含根据实施例18到31中任一项所述的试剂盒,其进一步包括可检测部分,并且所述检测试剂包括所述可检测部分的结合配偶体。

[0120] 实施例33包含根据实施例32所述的试剂盒,其中所述检测试剂包括生物素,并且所述可检测部分包括与亲和素或链霉亲和素缀合的辣根过氧化物酶。

[0121] 实施例34包含根据实施例18到33中任一项所述的试剂盒,其中所述捕获试剂、所述检测试剂或两者是冻干的。

[0122] 实施例35包含根据实施例18到33中任一项所述的试剂盒,其中所述捕获试剂、所述检测试剂或两者以溶液形式提供。

[0123] 实施例36包含根据实施例18到35中任一项所述的试剂盒,其进一步包括以下中的一种或多种:缓冲液、测定终止溶液、校准试剂、能够与检测试剂结合的可检测部分和可检测底物。

[0124] 实施例37包含根据实施例18所述的试剂盒,其中所述捕获试剂与AAV8结合,并且所述检测试剂与AAVx结合。

[0125] 实施例38是一种测定细胞悬浮液或细胞裂解物中的腺相关病毒的衣壳滴度的方法,所述方法包括:使所述细胞悬浮液或细胞裂解物经历高效液相色谱(HPLC),其中所述HPLC是用与所述腺相关病毒的病毒蛋白(VP)结合的树脂进行的;以及检测所述细胞悬浮液或细胞裂解物中的所述VP,由此测定所述腺相关病毒的衣壳滴度。

[0126] 实施例39包含根据实施例38所述的方法,其中所述检测包括在280nm下用分光光度法检测衣壳蛋白。

[0127] 实施例40包含根据实施例38所述的方法,其中所述腺相关病毒包括荧光部分,并且所述检测包括荧光检测。

[0128] 实施例41包含根据实施例38到40中任一项所述的方法,其中所述细胞裂解物是未纯化的细胞裂解物或部分纯化的细胞裂解物。

[0129] 实施例42包含根据实施例38到41中任一项所述的方法,其中所述HPLC是用包含在体积为约0.1mL到约1.0mL的柱中的所述树脂进行的。

[0130] 实施例43包含根据实施例38到42中任一项所述的方法,其中所述树脂包括抗体或其抗原结合片段。

[0131] 实施例44包含根据实施例38到43中任一项所述的方法,其中所述腺相关病毒包括Anc80。

[0132] 实例

[0133] 实例1.HPLC测定

[0134] 通过将POROSTMCAPTURESELECTTMAAVX亲和树脂(赛默飞世尔公司)填充到普林斯顿色谱有限公司(Princeton Chromatography, Inc.)的50×4.6mm HPLC柱中来制备广谱AAV(AAVX)亲和柱。使用具有荧光检测器的Agilent 1260 Infinity II生物惰性LC系统来评估具有各种AAV血清型样品的AAVX亲和柱,包含Anc80.CMV.eGFP、AAV2.CMV.eGFP和AAV8.CMV.eGFP。如图2A-2C所示,所述图描绘了分别针对Anc80.CMV.eGFP、AAV2.CMV.eGFP和AAV8.CMV.eGFP生成的标准曲线,观察到所有三种AAV血清型的响应线性度 $R^2 > 0.99$,其中检测下限为大约 6×10^8 个总病毒颗粒。

[0135] 进一步用Anc80的过程中样品对HPLC方法进行测试。在纯化过程的各个步骤期间,使用HPLC方法测试产生Anc80.CMV.eGFP的50L生物反应器。如图3所示,在所有测试步骤中成功地检测到Anc80.CMV.eGFP衣壳峰:细胞悬浮液、细胞裂解物、裂解物澄清后、切向流过

滤 (TFF) 后和最终过滤步骤后。

[0136] 基于线性回归分析测定过程中Anc80样品的滴度。还使用ddPCR测定滴度,并且如图4所示计算过程中样品的全/空衣壳比率。

[0137] 实例2.免疫测定

[0138] 使用抗AAV8捕获抗体和CAPTURESELECT™生物素抗AAVX缀合物(赛默飞世尔公司)作为检测抗体开发了针对Anc80的ELISA测定。使用 $R^2 > 0.99$ 的4参数逻辑回归(4-parameter logistic regression)来生成Anc80.CMV.eGFP的标准曲线(参见图5,标准曲线,以及图6,回归计算)。

[0139] 还将ELISA测定应用于来自产生Anc80.CMV.eGFP的50L生物反应器的过程中样品。测量过程中样品的滴度,并且结果与通过其它方法测量的滴度相当。

[0140] 本文所引用的所有参考文献,包含专利、专利申请、论文、教科书等,以及本文所引用的参考文献,就其尚未被引用的程度而言,在此通过引用整体并入。

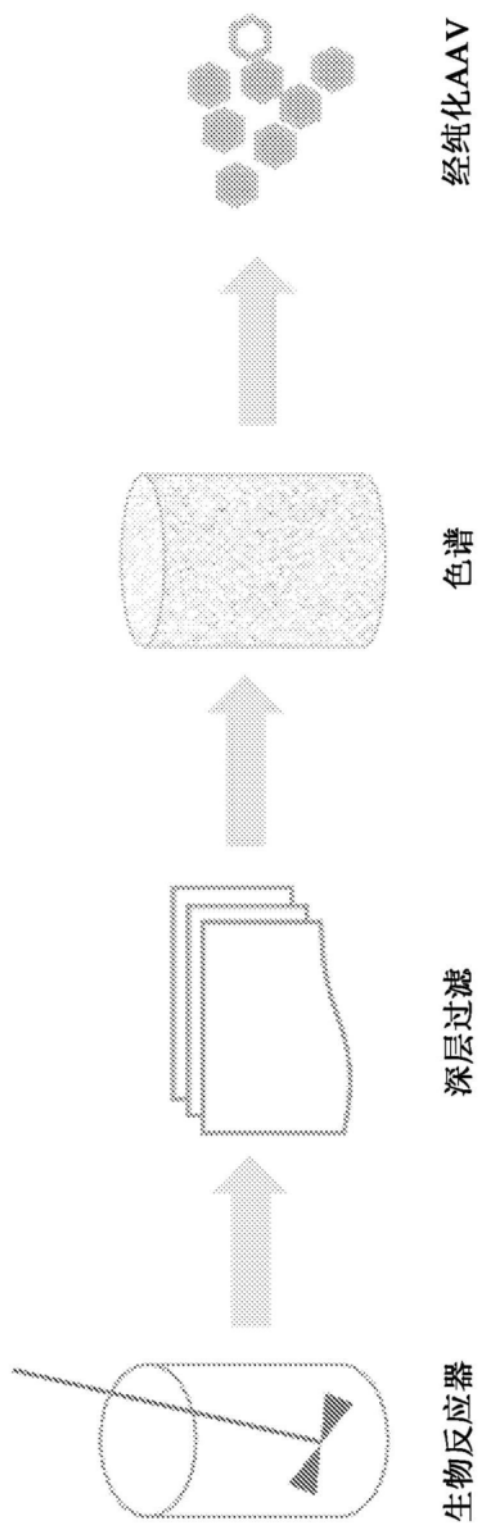


图1

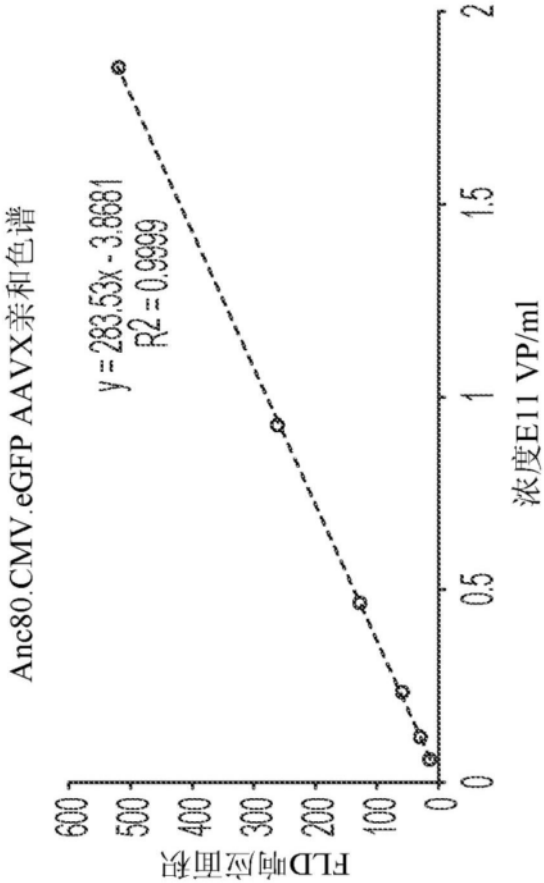


图2A

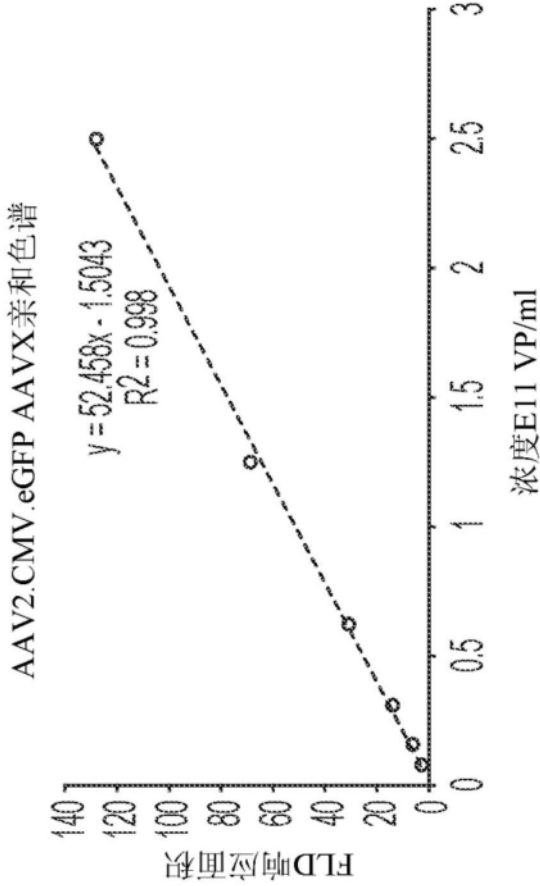


图2B

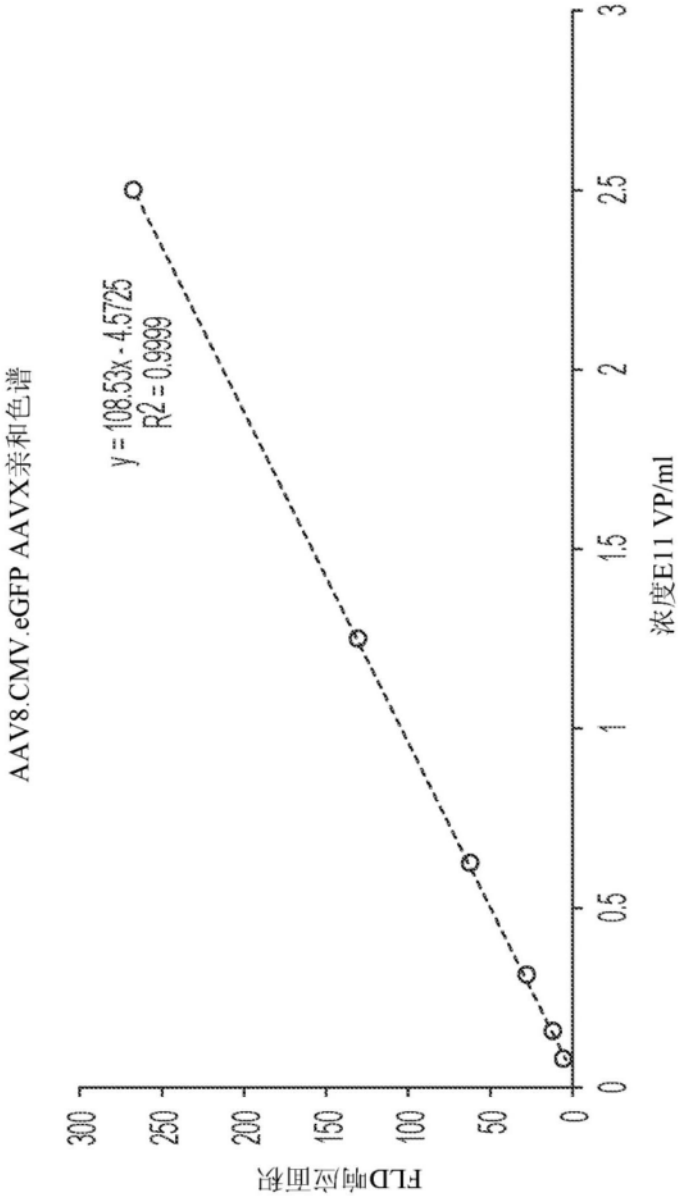


图2C

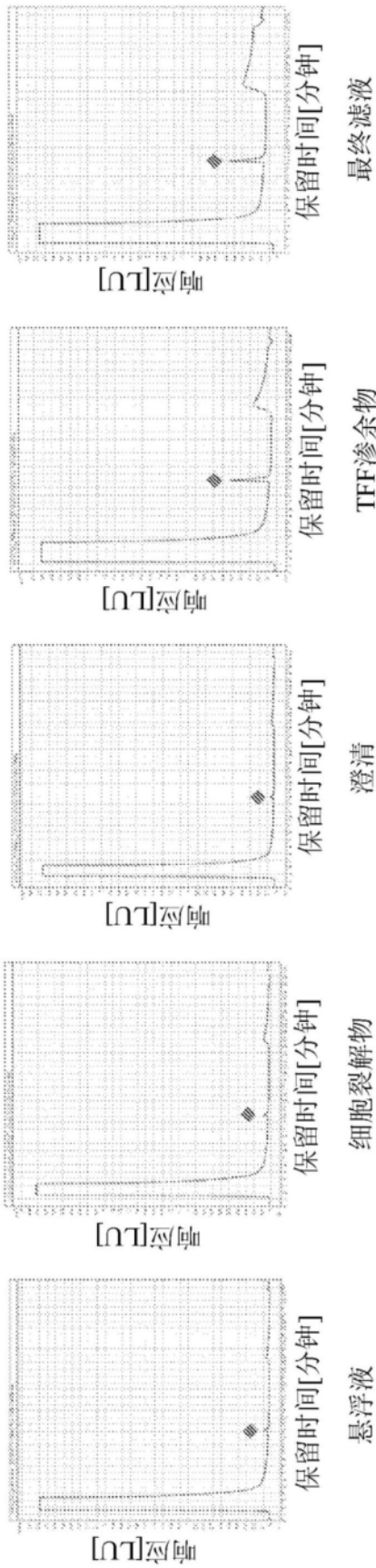


图3

	ddPCR滴度 (vg/mL)	HPLC滴度 (vp/mL)	全/总
悬浮液	不适用	7.09E+10	不适用
细胞裂解物	4.35E+10	8.01E+10	54%
澄清	2.96E+10	4.18E+10	71%
TFF渗余物	3.87E+11	6.13E+11	63%
最终滤液	3.68E+11	5.80E+11	63%

图4

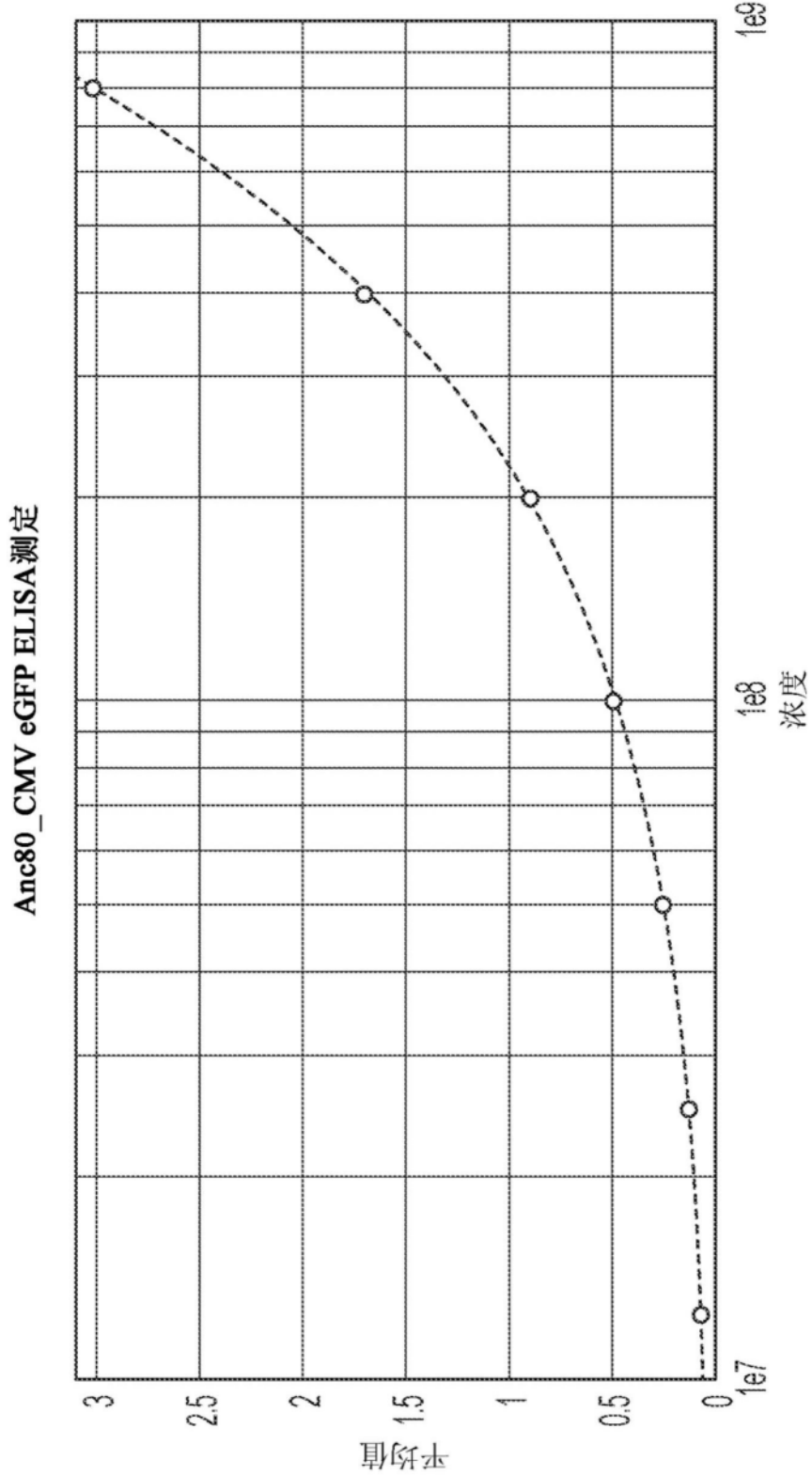


图5

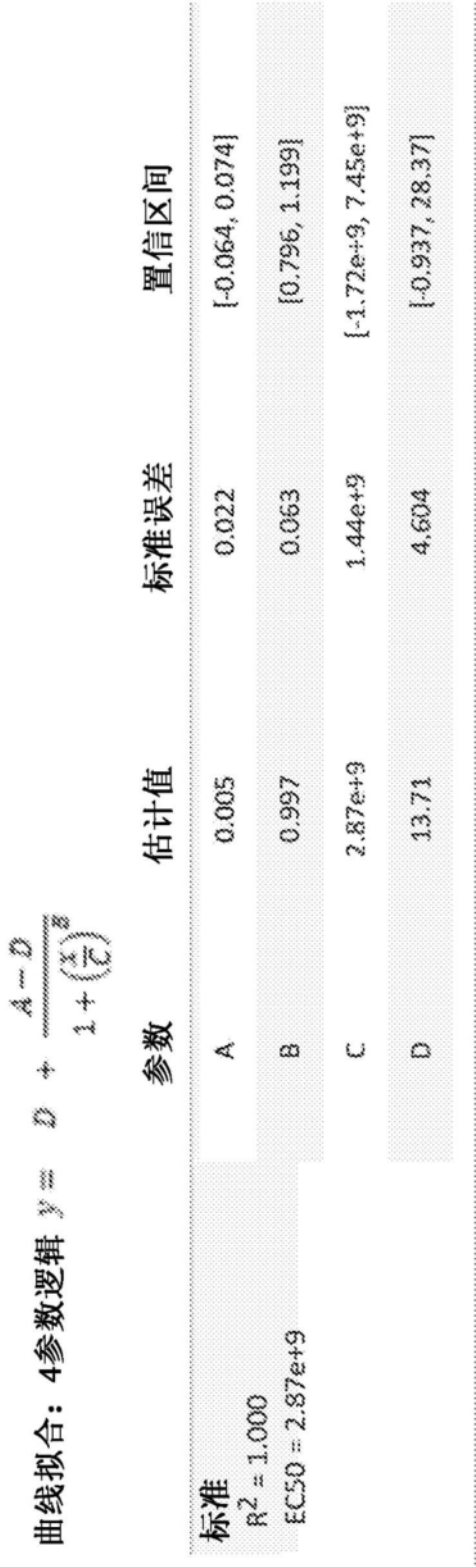


图6