(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119053692 A
(43)申请公布日 2024.11.29

(21)申请号 202380033234.3
(22)申请日 2023.04.07
(30)优先权数据
63/329,856 2022.04.11 US
63/331,438 2022.04.15 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.10.10
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/017838 2023.04.07
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/200679 EN 2023.10.19
(71)申请人 阿德夫拉姆生物技术股份有限公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 阿里·阿加贾尼雷法
(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司 11204
专利代理师 洪欣 伊硕
(51)Int.Cl.
C12N 7/02(2006.01)
C12N 15/11(2006.01)
C12N 15/85(2006.01)

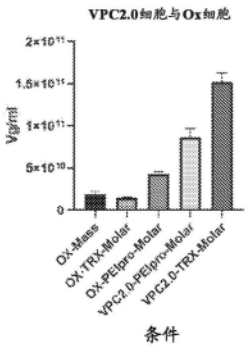
权利要求书2页 说明书18页
序列表（电子公布） 附图4页

(54)发明名称

用于提高rAAV滴度的HEK293悬浮平台的优化

(57)摘要

本发明提供了用于生产高滴度rAAV的方法和系统。所述高滴度rAAV可以用于药物组合物、基因疗法和研究。



CN 119053692 A

1.一种生产高滴度rAAV的方法,其包括(a)提供HEK293衍生的细胞,(b)用包含ITR表达载体、AAV辅助构建体、Rep和Cap的质粒共转染HEK293衍生的细胞,(c)孵育所转染的细胞和(d)收获所述rAAV。

2.如权利要求1所述的方法,其中Rep和Cap在单独的质粒上。

3.如权利要求1所述的方法,其中Rep和Cap在同一质粒上。

4.如权利要求1所述的方法,其中用于共转染所述细胞的转染试剂选自包括AAV-MAX和PEI-Pro的组。

5.如权利要求1所述的方法,其中所述HEK293衍生的细胞选自包括VPC2.0细胞和Oxford细胞的组。

6.如权利要求1所述的方法,其中所述HEK293衍生的细胞选自包括VPC2.0细胞和Oxford细胞的组,并且其中用于共转染所述细胞的所述转染试剂选自包括AAV-MAX和PEI-Pro的组。

7.如权利要求6所述的方法,其中所述HEK293衍生的细胞是VPC2.0细胞,并且所述转染试剂是AAV-Max。

8.如权利要求1所述的方法,其中所收获的rAAV的滴度为至少5x 10^{10}vg/ml。

9.如权利要求1所述的方法,其中用于共转染所述细胞的所述转染试剂选自包括AAV-MAX和PEI-Pro的组,并且其中Rep和Cap在单独的质粒上。

10.如权利要求9所述的方法,其中所述转染试剂是AAV-Max。

11.如权利要求1所述的方法,其中所述HEK293衍生的细胞选自包括VPC2.0细胞和Oxford细胞的组,并且其中Rep和Cap在单独的质粒上。

12.如权利要求11所述的方法,其中所述HEK293衍生的细胞是VPC2.0细胞。

13.如权利要求1所述的方法,其中所述HEK293衍生的细胞选自包括VPC2.0细胞和Oxford细胞的组,其中用于共转染所述细胞的所述转染试剂选自包括AAV-MAX和PEI-Pro的组,并且其中Rep和Cap在单独的质粒上。

14.如权利要求13所述的方法,其中所述HEK293衍生的细胞是VPC2.0细胞,所述转染试剂是AAV-Max,并且其中Rep和Cap在单独的质粒上。

15.如权利要求8所述的方法,其中所收获的rAAV的滴度为至少1x 10^{11}vg/ml。

16.一种用于生产高滴度rAAV的四质粒系统,其包括以下步骤:

(a)提供质粒集,所述质粒集包含第一质粒、第二质粒、第三质粒和第四质粒,所述第一质粒包含编码与第一启动子可操作地连接的AAV Rep多肽的核苷酸序列,所述第二质粒包含编码与第二启动子可操作地连接的AAV Cap多肽的核苷酸序列,所述第三质粒包含含有感兴趣的基因的ITR表达载体,所述第四质粒包含AAV辅助构建体;

(b)用所述质粒集转染HEK293衍生的细胞;

(c)孵育所转染的细胞;

(d)裂解所转染的细胞;和

(e)收获所述rAAV。

17.如权利要求16所述的系统,其中所述第二启动子是组成型活性启动子。

18.如权利要求17所述的系统,其中所述组成型活性启动子是CMV启动子。

19.如权利要求16所述的系统,其中所述第二启动子是p40启动子。

20.如权利要求16所述的系统,其中所述第一启动子是AAV启动子。

21.如权利要求16所述的系统,其中所述AAV启动子是p19启动子。

22.如权利要求16所述的系统,其中所述HEK293衍生的细胞选自包括HEK293细胞、VPC2.0细胞和Oxford细胞的组。

23.如权利要求16所述的系统,其中当归一化为质粒大小时,所述第一质粒与所述第三质粒的摩尔比和所述第二质粒与所述第三质粒的摩尔比是相当的。

24.如权利要求23所述的系统,其中当归一化为质粒大小时,所述质粒集中的四种质粒以大约1:1:1:1的摩尔比共转染。

25.如权利要求16所述的系统,其中当归一化为质粒大小时,所述第一质粒与所述第三质粒或所述第四质粒的摩尔比大于1:1。

26.如权利要求16所述的系统,其中当归一化为质粒大小时,所述第二质粒与所述第三质粒或所述第四质粒的摩尔比大于1。

27.如权利要求16所述的系统,其中当归一化为质粒大小时,所述第一质粒与所述第四质粒的摩尔比和所述第二质粒与所述第四质粒的摩尔比是相当的。

28.如权利要求16所述的系统,其中裂解所转染的细胞的方法包括选自包括以下项的组的至少一个步骤:冻融步骤、超声处理步骤、热化学步骤和替代化学方法步骤。

29.如权利要求16所述的系统,其中所收获的rAAV的滴度为至少5x 10^{10}vg/ml。

30.如权利要求29所述的系统,其中所收获的rAAV的滴度为至少1x 10^{11}vg/ml。

31.如权利要求30所述的系统,其中所收获的rAAV的滴度为至少3x 10^{11}vg/ml。

32.如权利要求16所述的系统,其中用所述质粒集转染HEK293衍生的细胞的步骤是共转染所述质粒集。

33.如权利要求16所述的系统,其中用所述集中的所述质粒转染HEK293衍生的细胞的步骤顺序发生。

用于提高rAAV滴度的HEK293悬浮平台的优化

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35U.S.C.§119(e)要求2022年4月11日提交的美国临时申请号63/329,856和2022年4月15日提交的美国临时申请号63/331,438的优先权;这些临时申请中的每一项以全文引用的方式并入。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 序列表的正式副本作为WIPO标准ST.26格式的XML文件与本说明书同时提交,文件名为“17234-037WO1_SequenceListing.xml”,创建日期为2023年4月6日,大小为若干字节。通过USPTO专利中心提交的该序列表是本说明书的一部分,并以全文引用的方式并入本文。

技术领域

[0005] 本发明涉及生产重组AAV的领域。

背景技术

[0006] AAV是4.7kb的单链DNA病毒。rAAV病毒体与优异的临床安全性相关,因为野生型AAV是非致病性的并且与任何已知疾病没有病因学关联。重组腺相关病毒(rAAV)载体作为体内基因递送媒介物的近期临床和非临床成功已经增加对产生各种天然和工程化血清型的高纯度和有效病毒载体的兴趣。AAV需要辅助基因的表达以有效复制。目前在人胚肾(HEK)293细胞中的rAAV生产系统包括提供辅助基因而不是辅助病毒的辅助质粒,并且因此被称为无辅助系统(helper free system)。

[0007] 用于施用治疗性核酸的AAV载体通常具有大约96%的亲本基因组缺失,使得仅保留含有用于DNA复制和包装的识别信号的末端重复序列(ITR)。这减少了由于病毒基因表达引起的免疫学或毒性副作用。此外,如果需要,将特异性AAV蛋白递送至生产细胞使得包含AAV ITR的AAV载体能够整合到细胞基因组的特定区域中。参见例如美国专利6342390和6821511。包含整合的AAV基因组的宿主细胞在细胞生长或形态上显示很少变化或没有变化(参见例如美国专利4797368)。

[0008] AAV ITR位于非结构复制(Rep)蛋白和结构衣壳(Cap)蛋白(也称为病毒体蛋白(VP))的独特编码核苷酸序列的侧翼。末端145个核苷酸是自身互补的并且被组织成使得可以形成能量稳定的形成T形发夹的分子内双链体。这些发夹结构通过充当细胞DNA聚合酶复合物的引物而起着病毒DNA复制的起点的作用。

[0009] 已经从腺病毒原液或从人或非人灵长类动物组织中分离出几种AAV血清型和100种以上的AAV变体。通常,AAV血清型在核酸序列和氨基酸序列水平上具有显著同源性的基因组序列,使得不同血清型具有相同的遗传功能集,产生物理上和功能上等同的病毒体,并且通过几乎相同的机制复制和组装。AAV血清型2(AAV2)已广泛用于基因疗法应用。

[0010] AAV Rep和ITR序列在许多AAV血清型中特别保守。此外,已知许多AAV血清型的Rep序列和ITR在哺乳动物细胞中产生AAV颗粒期间有效地交叉互补(即,功能性取代)来自其他血清型的相应序列。通常,决定AAV颗粒的细胞嗜性的Cap蛋白和相关的Cap蛋白编码序列在

不同AAV血清型之间明显不如Rep基因保守。鉴于Rep和ITR序列与其他血清型的相应序列交叉互补的能力,AAV载体可以包含血清型的混合物,从而包含“嵌合”或“假型化”AAV载体。嵌合AAV载体包含衍生自两种或更多种(例如,2种、3种、4种等)不同AAV血清型的AAV衣壳蛋白。相反,假型化AAV载体包含包装到另一种AAV血清型的衣壳中的一种AAV血清型的一个或多个ITR。嵌合和假型进一步描述于例如美国专利6,723,551;Flotte(2006)Mol Ther 13(1):1-2;Gao等人(2004)J.Virol 6381-6388;Gao等人(2002)Proc Natl Acad Sci USA 99:11854-11859;De等人(2006)Mol Ther13:67-76;以及Gao等人(2006)Mol Ther 13:77-87中。

[0011] 在研究实验室中生产重组腺相关病毒(rAAV)的最常用方法是通过用AAV顺式质粒和反式质粒以及腺病毒辅助质粒瞬时三重转染293细胞。三重转染HEK293平台常规用于rAAV生产,并且利用编码感兴趣的基因的AAV顺式质粒、包含衣壳基因和复制酶基因的AAV反式质粒和辅助质粒。然而,目前使用的大多数HEK293制造平台产生低滴度并且不可扩展。

发明内容

[0012] 本文提供了产生高滴度rAAV的方法和系统。通过这些方法和系统生产的rAAV可以用于药物组合物、基因疗法组合物中,用于研究目的和用于其他用途。

[0013] 在一个实施方案中,提供了一种生产高滴度rAAV的方法,所述方法包括以下步骤:提供HEK293衍生的细胞,用包含ITR表达载体、AAV辅助构建体、Rep和Cap的质粒共转染HEK293衍生的细胞,孵育转染的细胞以及收获rAAV。在所述方法的一个方面,Rep和Cap在单独的质粒上。在一个方面,Rep和Cap在同一质粒上。在所述方法的各个方面,用于共转染细胞的转染试剂选自包括AAV-Max和PEI-Pro的组。在各个方面,HEK239衍生的细胞选自包括VPC2.0和Oxford细胞的组。在一个方面,HEK293衍生的细胞选自包括VPC2.0细胞和Oxford细胞的组,并且其中用于共转染细胞的转染试剂选自包括AAV-Max和PEI-Pro的组。在所述方法的各个方面,HEK293衍生的细胞是VPC2.0细胞,并且转染试剂是AAV-Max。在一个方面,收获的rAAV的滴度为至少5x 10^{10}vg/ml。在各个方面,用于共转染细胞的转染试剂选自包括AAV-Max和PEI-Pro的组,并且Rep和Cap在单独的质粒上。在各个方面,用于共转染细胞的转染试剂选自包括AAV-Max和PEI-Pro的组,并且Rep和Cap在同一质粒上。在一个方面,用于共转染细胞的转染试剂是AAV-Max,并且Rep和Cap在单独的质粒上。在一个方面,用于共转染细胞的转染试剂是TRX,Rep和Cap在单独的质粒上,并且HEK293衍生的细胞是VPC2.0细胞。在各个方面,HEK293衍生的细胞选自包括VPC2.0细胞和Oxford细胞的组,用于共转染细胞的转染试剂选自包括AAV-Max和PEI-Pro的组,并且Rep和Cap在单独的质粒上。在一些方面,HEK293衍生的细胞是VPC2.0细胞,转染试剂是AAV-Max并且Rep和Cap在单独的质粒上。在各个方面,收获的rAAV的滴度为至少1x 10^{11}vg/ml。

[0014] 提供了用于生产高滴度rAAV的四质粒系统。用于生产高滴度rAAV的四质粒系统包括以下步骤:提供质粒集,所述质粒集包含第一质粒、第二质粒、第三质粒和第四质粒,所述第一质粒包含编码与第一启动子可操作地连接的AAV Rep多肽的核苷酸序列,所述第二质粒包含编码与第二启动子可操作地连接的AAV Cap多肽的核苷酸序列,所述第三质粒包含含有感兴趣的基因的ITR表达载体,所述第四质粒包含AAV辅助构建体;用所述质粒集转染HEK293衍生的细胞;孵育所转染的细胞;裂解所转染的细胞;以及收获所述rAAV。在所述系

统的各个方面,第二启动子是组成型活性启动子。在某些方面,组成型活性启动子是CMV启动子。在所述系统的各个方面,第二启动子是p40启动子。在所述系统的各个方面,第一启动子是AAV启动子。在某些方面,AAV启动子选自包括p5启动子和p19启动子的组。在所述系统的各个方面,HEK293衍生的细胞选自包括HEK293细胞、VPC2.0细胞和Oxford细胞的组。在所述系统的各个方面,当归一化为质粒大小时,第一质粒与第三质粒的摩尔比和第二质粒与第三质粒的摩尔比是相当的。在各个方面,当归一化为质粒大小时,所述质粒集的四种质粒以大约1:1:1:1的摩尔比共转染。在各个方面,当归一化为质粒大小时,第一质粒与第三质粒或第四质粒的摩尔比大于1:1。在各个方面,当归一化为质粒大小时,第二质粒与第三质粒或第四质粒的摩尔比大于1:1。在一些方面,当归一化为质粒大小时,第一质粒与第四质粒的摩尔比和第二质粒与第四质粒的摩尔比是相当的。在某些方面,当归一化为质粒大小时,Rep质粒和Cap质粒的摩尔比是相当的。

[0015] 在各个方面,裂解转染的细胞的方法包括选自包括以下项的组的至少一个步骤:冻融步骤、超声处理步骤、热化学步骤和替代化学方法步骤。

[0016] 在一个方面,收获的rAAV的滴度为至少5x 10^{10}vg/ml。在一个方面,收获的rAAV的滴度为至少1x 10^{11}vg/ml。在其他方面,收获的rAAV的滴度为至少3x10^{11} vg/ml。

[0017] 在系统的各个方面,用所述质粒集转染HEK293衍生的细胞的步骤是共转染质粒集。在其他方面,用所述集中的质粒转染HEK293衍生的细胞的步骤顺序发生。

[0018] 以引用的方式并入

[0019] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请以全文引用的方式并入本文,就如每个单独的出版物、专利或专利申请被具体地和单独地指出以引用的方式并入的程度一样。

附图说明

[0020] 图1提供了总结在用指定的转染试剂共转染之后由指定的HEK293衍生的细胞产生的重组病毒(rAAV2.7 m8-Fluc)在病毒基因组中的滴度/ml(vg/ml)的图表。AAV ITR表达载体、pAAV Rep-Cap基因和pHelper的共转染在AAV-Max(TRX)转染试剂或PEIPro(PEIPRO)转染试剂的存在下发生。将质粒转染到VPC2.0细胞(VPC2.0)或Oxford细胞(OX)中。标记OX-TRX-Molar、OX-PEIPro-Molar、VPC2.0-TRX-Molar和VPC2.0-PEIPro-Molar的柱的数据是从其中细胞分别用归一化为质粒大小的1:2:0.5摩尔比的pAAV ITR表达载体、pAAV Rep-Cap基因和pHelper共转染的实验中获得的。在这一系列实验中,用VPC2.0-PEIPro-Molar条件获得的重组AAV滴度大于5x10^{10}vg/ml。在这一系列实验中,用VPC2.0-TRX-Molar条件获得的重组AAV滴度为至少1x 10^{11}vg/ml。从使用等摩尔浓度的Rep-Cap质粒、辅助质粒和感兴趣的基因(GOI)质粒(1:1:1)的实验中获得标记OX-mass的柱的数据。

[0021] 图2提供了总结在通过x轴上所示的方法裂解之后从在PEIPro转染试剂的存在下用pAAV ITR表达载体、pAAV Rep-Cap基因和pHelper共转染的Oxford细胞获得的rAAV滴度(y轴,vg/ml)的图表。显示了从通过冻融法(FT)、超声处理法(SC)、热化学方法(Thermo)或替代化学方法(ALT)裂解的细胞获得的结果。

[0022] 图3提供了总结从用归一化为质粒大小的指定摩尔比的pAAV ITR表达载体、pAAV Rep-Cap基因和pHelper共转染的VPC2.0细胞获得的rAAV滴度的图表。

[0023] 图4提供了总结从用指定转染试剂(PEIpro或TRX)共转染的指定细胞类型(Oxford(OX)或VPC2.0(VPC2.0))获得的rAAV滴度的图表。将相同的感兴趣的基因或转基因插入相同的主链中,但是转基因与886信号肽(886,SEQ ID NO:1)或1176信号肽(1176,SEQ ID NO:2)连接。具有不同信号肽的1176构建体导致更高的滴度。

[0024] 图5提供了用于在两种不同类型的HEK衍生细胞(Oxford或VPC2.0)中生产rAAV的三质粒系统的示意性描绘。

[0025] 图6提供了总结在用3质粒系统(3种质粒)或4质粒系统(4种质粒)共转染之后在VPC2.0细胞中产生的rAAV滴度的图表。在常规的3质粒系统中,用pAAV ITR表达载体、pAAV Rep-Cap基因和pHelper共转染细胞。在3质粒系统中,Rep和Cap基因在同一质粒上。在4质粒系统中,用pAAV ITR表达载体、pAAV Rep基因、pAAV-CMV-Cap基因和pHelper共转染细胞。Rep基因和Cap基因在单独的质粒上。从四质粒系统获得的滴度增加是显著的。

[0026] 图7提供了用于在HEK衍生的细胞中产生rAAV的三质粒系统和四质粒系统的示意性描绘。

具体实施方式

[0027] 本文提供了用于产生高滴度rAAV的方法和系统。所述方法允许以比通常通过标准生产方法实现的滴度显著更高的滴度生产rAAV。

[0028] 以下段落更详细地描述了本发明的不同方面。除非明确相反地指出,否则本发明的每个方面、实施方案或特征可以与本发明的任何其他方面、实施方案或特征组合。

[0029] 定义

[0030] 除非另外定义,否则本文所使用的所有技术性和科学性术语具有本发明所属领域中的普通技术人员通常所理解的含义。

[0031] 本文使用的术语仅用于描述特定实施例的目的,并不旨在限制。如本文使用,除非上下文明确另外指示,否则单数形式“一个”、“一种”和“所述”旨在也包括复数形式。此外,在具体实施方式和/或权利要求书中使用术语“包括(including/includes)”、“具有(having/has/with)”或其变型的程度上,此类术语旨在以类似于术语“包含”的方式具有包容性。如本文所用的术语“包含”与“包括”或“含有”同义,并且是包容性的或开放式的。除非另有说明,否则本文中对“或”的任何提及旨在涵盖“和/或”。

[0032] 如本文所用,术语“约”某个数是指该数加上或减去该数的10%。术语“约”某个范围是指该范围减去其最低值的10%和加上其最大值的10%。本文对“约”某个值或参数的提及包括(并描述)针对该值或参数本身的实施方案。

[0033] “高滴度”是指颗粒或病毒体的浓度在稀释之前处于或高于预定阈值;如果在收获时可获得预定阈值,则由于稀释或使用更大体积来收获颗粒或病毒体而产生的具有较低滴度的病毒制剂被术语“高滴度”涵盖。滴度类型可以选自但不限于总衣壳滴度、基因组滴度、物理滴度、病毒制剂的感染滴度以及完全衣壳与空衣壳的比率。应当认识到,使用不同的方法评估不同的滴度类型,并且病毒颗粒的特定等分试样的每种滴度类型的值可以不同。应当理解,对于至少一种滴度类型,“高滴度”制剂仅需要具有高浓度的颗粒。术语“基因组滴度”和“物理滴度”在本文中可互换使用。基因组滴度被理解为每毫升的病毒基因组浓度(vg/ml)。评估基因组滴度的方法是本领域已知的,并且包括但不限于定量实时PCR(qPCR)

和数字液滴PCR(ddPCR)。总衣壳滴度代表样品中所有完整(完全组装的)病毒衣壳(包括完全衣壳和空衣壳两者)的量。评估衣壳滴度的方法是本领域已知的,并且包括但不限于基于抗体的方法、ELISA和斑点印迹。确定完全颗粒与空颗粒的比率的方法是本领域已知的,并且包括但不限于冷冻电子显微术、阴性染色、以及确定基因组滴度和衣壳滴度的方法的组合。参见例如Gimpel等人(2021)Mol Therapy:Methods&Clin Dev 20:740-754。“高滴度”rAAV的预定阈值包括但不限于5x 10^{10}vg/ml、5.5x 10^{10}vg/ml、6x 10^{10}vg/ml、6.5x 10^{10}vg/ml、7x 10^{10}vg/ml、7.5x 10^{10}vg/ml、8x 10^{10}vg/ml、8.5x 10^{10}vg/ml、9x 10^{10}vg/ml、9.5x 10^{10}vg/ml、1x 10^{11}vg/ml、1.5x 10^{11}vg/ml、2x 10^{11}vg/ml、2.5x 10^{11}vg/ml、3x 10^{11}vg/ml、3.5x10^{11}vg/ml、4x 10^{11}vg/ml、4.5x 10^{11}vg/ml、5x 10^{11}vg/ml、5.5x 10^{11}vg/ml、6x 10^{11}vg/ml、6.5x 10^{11}vg/ml、7x 10^{11}vg/ml、7.5x 10^{11}vg/ml、8x 10^{11}vg/ml、8.5x 10^{11}vg/ml、9x 10^{11}vg/ml、9.5x 10^{11}vg/ml、1x 10^{12}vg/ml和5x 10^{12}vg/ml。高滴度rAAV可以具有在至少大约5x 10^{10}vg/ml、5.5x 10^{10}vg/ml、6x 10^{10}vg/ml、6.5x 10^{10}vg/ml、7x 10^{10}vg/ml、7.5x 10^{10}vg/ml、8x 10^{10}vg/ml、8.5x 10^{10}vg/ml、9x 10^{10}vg/ml、9.5x10^{10}vg/ml、1x 10^{11}vg/ml、1.5x 10^{11}vg/ml、2x 10^{11}vg/ml、2.5x 10^{11}vg/ml、3x 10^{11}vg/ml、3.5x 10^{11}vg/ml、4x 10^{11}vg/ml、4.5x 10^{11}vg/ml、5x 10^{11}vg/ml、5.5x 10^{11}vg/ml、6x 10^{11}vg/ml、6.5x 10^{11}vg/ml、7x 10^{11}vg/ml、7.5x 10^{11}vg/ml、8x 10^{11}vg/ml、8.5x 10^{11}vg/ml、9x 10^{11}vg/ml、9.5x 10^{11}vg/ml、1x 10^{12}vg/ml和5x 10^{12}vg/ml的范围内的浓度。

[0034] 在一些实施方案中,本申请的方法和系统可以用于产生用于受试者的rAAV病毒体。在各个方面,受试者是指哺乳动物。哺乳动物包括但不限于家养动物(例如,牛、羊、猫、狗和马)、灵长类动物(例如,人和非人灵长类动物诸如猴)、兔和啮齿动物。在某些实施方案中,“受试者”、“患者”或“个体”是指灵长类动物,诸如人和非人灵长类动物(例如,非洲绿猴和恒河猴)。在一些实施方案中,受试者是人。

[0035] 如本文所用的术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”、“改善(ameliorate)”或“改善(ameliorating)”和其他语法等同物是指减轻、消除或改善疾病或病症、或疾病或病症的症状,预防疾病或病症的附加症状,改善或预防症状的潜在代谢原因,抑制疾病或病症(例如,阻止疾病或病症的发展),缓解疾病或病症,引起疾病或病症的消退,或停止疾病或病症的症状,并且旨在包括预防。术语还包括实现治疗益处和/或预防益处。术语“治疗益处”是指根除或改善所治疗的疾病或病症。此外,通过根除或改善与疾病或病症相关的一种或多种生理症状来实现治疗益处,使得在受试者中观察到改善,尽管在一些实施方案中,受试者仍然患有疾病或病症。为了预防益处,将药物组合物施用于处于发生疾病或病症的风险中的受试者,或施用于报告疾病或病症的一种或多种生理症状的受试者,即使疾病或病症尚未诊断。

[0036] 如本文所用的术语“施用(administer)”、“施用(administering)”、“施用(administring)”等可以指用于使治疗剂或药物组合物能够递送至期望的生物作用部位的方法。

[0037] 如本文所用的术语“有效量”、“治疗有效量”或“药学有效量”可以指施用的至少一种药物组合物或化合物将足以在一定程度上缓解所治疗的眼部疾病或病症的一种或多种症状的量。药物组合物的“有效量”、“治疗有效量”或“药学有效量”可以作为单位剂量施用于有需要的受试者(如本文别处进一步详细描述的)。

[0038] 如本文所用的术语“药学上可接受的”可以指不消除本文所公开的化合物的生物活性或特性并且相对无毒的材料(诸如载体或稀释剂)(即,当将所述材料施用于个体时,其不会引起不期望的生物效应,也不会以有害方式与包含其的组合物的任何组分相互作用)。

[0039] 如本文所用的术语“药物组合物”或简称“组合物”可以指生物活性化合物,其任选地与至少一种药学上可接受的化学组分混合,所述药学上可接受的化学组分诸如但不限于载剂、稳定剂、稀释剂、分散剂、悬浮剂、增稠剂、赋形剂等。

[0040] 如本文所用的“AAV载体”或“rAAV载体”是指腺相关病毒(AAV)载体或重组AAV(rAAV)载体,其包含用于转导到靶细胞或靶组织中的非AAV来源的多核苷酸序列(例如,与AAV异源的多核苷酸,诸如编码治疗性转基因(例如,阿柏西普)的核酸序列)。通常,异源多核苷酸的侧翼是至少一个且通常两个AAV反向末端重复序列(ITR)。术语rAAV载体涵盖rAAV载体颗粒和rAAV载体质粒两者。rAAV载体可以是单链的(ssAAV)或自身互补的(scAAV)。

[0041] “AAV病毒”或“AAV病毒颗粒”或“rAAV载体颗粒”或“rAAV颗粒”或“rAAV病毒体”或“rAAV病毒”是指包含至少一种AAV衣壳蛋白和多核苷酸rAAV载体的病毒颗粒。在一些情况下,所述至少一种AAV衣壳蛋白来自野生型AAV或者是变体AAV衣壳蛋白(例如,具有插入(例如,如下所述的7m8氨基序列的插入)的AAV衣壳蛋白)。如果颗粒包含异源多核苷酸(例如,除了野生型AAV基因组之外的多核苷酸,诸如待递送至靶细胞或靶组织的转基因),则其被称为“rAAV颗粒”、“rAAV载体颗粒”或“rAAV载体”。因此,rAAV颗粒的产生必须包括rAAV载体的产生,这样载体包含在rAAV颗粒内。

[0042] 如本文所用的术语“包装”可以指可以导致rAAV颗粒的组装和衣壳化的一系列细胞内事件。

[0043] AAV“rep”和“cap”基因是指编码腺相关病毒及其变体的复制和衣壳化蛋白质的多核苷酸序列。Rep基因编码Rep蛋白Rep78、Rep68、Rep52和Rep40。Rep78和Rep68从p5启动子转录,并且Rep52和Rep40从p19启动子转录。Rep79和Rep68蛋白是多功能DNA结合蛋白,其在生产性复制期间执行解旋酶和切口酶功能以允许AAV末端的解析(参见例如Im等人1990 Cell 61:447-57)。这些蛋白质还调节来自内源性AAV启动子和辅助病毒内的启动子的转录(参见例如Periera等人(1997)J.Virol 71:1079-1088)。其他Rep蛋白修饰Rep78和Rep68的功能。在本申请的四质粒系统中,Rep可以与AAV启动子(包括但不限于p19和p5)可操作地连接。“Rep”涵盖变体Rep、嵌合Rep和修饰的Rep。

[0044] Cap基因编码衣壳蛋白VP1、VP2和VP3。Cap基因从p40启动子转录。在本申请的四质粒系统中,Cap可操作地连接至组成型活性启动子。Cap涵盖变体Cap、嵌合Cap、假型化Cap和修饰的Cap。本领域技术人员将知道哪些Rep和Cap形式一起使用是优选的,并且将适当地选择。

[0045] 术语“多肽”可以涵盖天然存在的和非天然存在的蛋白质(例如,融合蛋白)、肽、片段、突变体、衍生物及其类似物。多肽可以是单体的、二聚体的、三聚体的或多聚体的。此外,多肽可以包含许多不同的结构域,每个结构域具有一种或多种不同的活性。为了避免疑问,“多肽”可以是大于两个氨基酸的任何长度。

[0046] 如本文所用,“多肽变体”或简称“变体”是指其序列含有氨基酸修饰的多肽。在一些实施方案中,修饰是与参考蛋白质或多肽(诸如天然或野生型蛋白质)的氨基酸序列相比一个或多个氨基酸的插入、复制、缺失、重排或取代。变体可以具有其中一个位置处的单个

氨基酸已经改变为另一种氨基酸的一个或多个氨基酸点取代、其中在参考蛋白至的序列中分别插入或缺失一个或多个氨基酸的一个或多个插入和/或缺失、以及/或者在氨基末端或羧基末端之一或两者处的氨基酸序列的截短。与参考蛋白质或未修饰的蛋白质相比,变体可以具有相同或不同的生物活性。

[0047] 在一些实施方案中,变体可以例如与其对应参考蛋白质具有至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的总体序列同源性。在一些实施方案中,变体可以与野生型蛋白质具有至少约90%的总体序列同源性。在一些实施方案中,变体表现出至少约95%、至少约98%、至少约99%、至少约99.5%或至少约99.9%的总体序列同一性。

[0048] 如本文所用,“重组”可以指生物分子(例如基因或蛋白质)(1)已从其天然存在的环境中移除,(2)不与其中在自然界中发现该基因的多核苷酸的全部或一部分相关,(3)可操作地连接至其在自然界中不连接的多核苷酸,或(4)在自然界中不存在。术语“重组”可以用于指克隆的DNA分离物、化学合成的多核苷酸类似物或通过异源系统生物合成的多核苷酸类似物、以及由此类核酸编码的蛋白质和/或mRNA。因此,例如,由微生物合成的蛋白质是重组的,例如,如果其是由从细胞中存在的重组基因合成的mRNA合成的。

[0049] “有效地连接的”或“可操作地连接的”或“偶联的”可以指遗传元件的并置,其中元件处于允许它们以预期的方式操作的关系中。例如,如果启动子有助于启动编码序列的转录,则启动子可以与编码区可操作地连接。在启动子与编码区之间可以存在中间残基,只要这种功能关系得以维持即可。

[0050] 术语“表达载体”或“表达构建体”或“盒”或简称“载体”可以包括任何类型的遗传构建体(包括AAV或rAAV载体),其含有编码基因产物的核酸或多核苷酸,其中部分或全部核酸编码序列能够被转录并适于基因疗法。转录物可以被翻译成蛋白质。在一些实施方案中,转录物被部分翻译或不被翻译。在某些方面,表达包括基因的转录和mRNA翻译成基因产物两者。在其他方面,表达仅包括编码感兴趣的基因的核酸的转录。表达载体还可以包含与编码区可操作地连接的控制元件,以促进蛋白质在靶细胞中的表达。控制元件和它们可操作地连接用于表达的一个或多个基因的组合有时可以被称为“表达盒”,许多表达盒是本领域已知的和可获得的或者可以容易地由本领域可获得的组分构建。

[0051] “基因产物”是由特定基因的表达产生的分子。基因产物包括例如多肽、适体、干扰RNA、mRNA(信使RNA)等。在特定实施方案中,“基因产物”是多肽、肽、蛋白质或干扰RNA,包括短干扰RNA(siRNA)、miRNA(微小RNA)或小发夹RNA(shRNA)。在特定实施方案中,基因产物是治疗性基因产物,例如治疗性蛋白质。在一些方面,基因产物提供基因功能的敲低。在一些方面,基因产物提供基因功能的增加。

[0052] 在一些实施方案中,感兴趣的基因可编码报告基因产物,诸如但不限于GFP和RFP。在一些实施方案中,感兴趣的基因可编码治疗性基因产物,诸如治疗性蛋白质。治疗性基因产物是本领域已知的,并且包括但不限于多肽激素、细胞因子或生长因子(例如胰岛素或促红细胞生成素)、干扰素、凝血因子、疫苗、抗血管生成多肽、血管内皮生长因子(VEGF)结合蛋白、抗VEGF剂、抗VEGF蛋白、视蛋白蛋白质、抗C3抗体、抗C5抗体、激素受体(诸如但不限于盐皮质类固醇、糖皮质激素和甲状腺激素受体)、膜内蛋白(诸如但不限于TM-1和TM-7)、细胞内受体(诸如但不限于孤独基因、类视黄醇、维生素D3和维生素A受体)、信号传导分子(诸

如但不限于激酶,细胞因子超家族的转录因子和信号转导子以及转录受体的激活剂(例如促红细胞生成素、生长激素、干扰素、白细胞介素和集落刺激因子);G蛋白偶联受体,诸如但不限于激素、降钙素、肾上腺素、胃泌素、旁分泌或自分泌介质,诸如生长抑素或前列腺素;神经递质受体(去甲肾上腺素、多巴胺、血清素或乙酰胆碱);酪氨酸激酶受体的配体,诸如胰岛素生长因子和神经生长因子;以及抗干性AMD基因产物。抗VEGF剂是本领域已知的,并且包括但不限于贝伐珠单抗、布西珠单抗(brolucizumab)、雷珠单抗、法瑞西单抗、培戈-阿比西帕(abicipar pegol)、康柏西普、OPT-302、KSI-301、可注射的马来酸舒尼替尼(GB-102)、PAN-90806(PanOptica)和/或阿柏西普。

[0053] 术语“抗VEGF剂”包括任何治疗剂,包括蛋白质、多肽、肽、融合蛋白、多聚体蛋白、基因产物、抗体、人单克隆抗体、抗体片段、适体、小分子、激酶抑制剂、受体或受体片段或核酸分子,它们可以在体内降低、干扰、破坏、阻断和/或抑制内源性VEGF和/或内源性VEGF受体(VEGFR)的活性或功能或VEGF-VEGFR相互作用或途径。抗VEGF剂可以是当体内递送到细胞、组织或受试者中时可减少新血管生长或形成和/或水肿或肿胀的任何一种已知治疗剂,例如雷珠单抗、布西珠单抗或贝伐珠单抗。在一些实施方案中,抗VEGF剂可以是天然存在的、非天然存在的或合成的。在一些实施方案中,抗VEGF剂可以衍生自随后被修饰或突变以赋予抗VEGF活性的天然存在的分子。在一些实施方案中,抗VEGF剂是融合蛋白或嵌合蛋白。在此类蛋白质中,功能结构域或多肽被人工融合到部分或多肽以制备可以在体内隐退VEGF或用作VEGFR诱饵的融合蛋白或嵌合蛋白。在一些实施方案中,抗VEGF剂是阻断内源性VEGFR与其配体相互作用的融合蛋白或嵌合蛋白。

[0054] 如本文所用,“VEGF”可以指VEGF的任何同种型,除非另有要求,包括但不限于VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、VEGF-F或其任何组合、或任何功能片段或变体。除非另有要求,“VEGF”可以指VEGF家族的任何成员,包括成员:VEGF-A、胎盘生长因子(PGF)、VEGF-B、VEGF-C和VEGF-D、或其任何组合、功能片段或变体。如本文所用,“VEGF受体”或“VEGFR”或“VEGF-R”可以用于指VEGF的任何一种受体,包括但不限于VEGFR-1(或Flt-1)、VEGFR-2(或Flk-1/KDR)和VEGFR-3(或Flt-4)。VEGFR可以是膜结合形式或可溶性形式、或受体的功能片段或截短。

[0055] 用于治疗眼部疾病或病症的治疗性基因产物可包括但不限于抗血管生成多肽、VEGF结合蛋白、视蛋白蛋白质、抗C3抗体、抗C5抗体、抗干性AMD基因产物、阿柏西普、sFLT-1、CFI、雷珠单抗和贝伐珠单抗。抗干性AMD基因产物可包括但不限于C3、C5、HtrA1、C1qm的抑制剂和补体途径的天然抑制剂,诸如CFI、CFH和CD59。

[0056] 如本文所用,“治疗性基因”是指当表达时产生治疗性基因产物的基因,所述治疗性基因产物在其存在时对细胞或组织或对其中表达所述基因的哺乳动物赋予有益效果。有益效果的实例包括改善病状或疾病的体征或症状,预防或抑制病状或疾病,或赋予期望的特征。治疗性基因包括但不限于纠正细胞或哺乳动物中遗传缺陷的基因以及表达治疗性基因产物的基因。

[0057] 术语“异源的”可以指在基因型上不同于与其进行比较的其余实体的实体。例如,通过基因工程技术引入从不同物种来源的质粒或载体中的多核苷酸可以是异源多核苷酸。从其天然编码序列去除并与其未天然连接的编码序列可操作地连接的启动子可以是异源启动子。

[0058] 除非另有说明,否则本文所述的方法、系统和试剂盒可以采用在本领域技术人员的技能范围内的分子生物学(包括重组技术)、细胞生物学、生物化学、免疫化学和病毒学技术的常规技术和描述。此类常规技术包括用于克隆和繁殖重组病毒的方法、药物组合物的配制以及生物化学纯化和免疫化学。合适技术的具体说明可以参考本文的实例。然而,也可使用等效的常规程序。此类常规技术和描述可以在标准实验室手册中找到,所述标准实验室手册诸如Weiner等人,编辑,Genetic Variation:a Laboratory Manual(2007);Dieffenbach,Dveksler(编辑),PCR Primer:a Laboratory Manual(2003);Sambrook和Russell,Condensed Protocols from Molecular Cloning:a Laboratory Manual(2006),所有这些文献出于所有目的据此以全文引用的方式并入。

[0059] 天然和工程化血清型可以用于本文提供的方法和系统中。天然和工程化血清型可以包括但不限于AAV 1型(AAV1)、AAV 2型(AAV2)、AAV 3型(AAV3)、AAV 4型(AAV4)、AAV 5型(AAV5)、AAV 6型(AAV6)、AAV 7型(AAV7)、AAV 8型(AAV8)、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类动物AAV、非灵长类动物AAV、恒河猴AAV、绵羊AAV、AAV2.7m8、AAVrh10、AAVr100和LSV1。已经从腺病毒原液或从人或非人灵长类动物组织中分离出几种AAV血清型和100种以上AAV变体(综述于例如Wu等人(2006)Molecular Ther.14(3):316-327)。通常,AAV血清型在核酸序列和氨基酸序列水平上具有显著同源性的基因组序列,使得不同血清型具有相同的遗传功能集,产生实质上、物理上和功能上等同的病毒体,并且通过实际上相同的机制复制和组装。AAV血清型1-5和7-9被定义为“真正”血清型,因为它们不与对所有其他现有的和表征的血清型具有特异性的中和血清有效地交叉反应。相比之下,AAV血清型6、10(也称为Rh10)和11被认为是“变体”血清型,因为它们不符合“真实”血清型的定义。AAV血清型2(AAV2)由于其缺乏致病性、广泛的感染性和建立长期转基因表达的能力而被广泛用于基因疗法应用(参见例如Carter,BJ(2005)Hum Gene Ther 16:541-550以及Wu等人各种AAV血清型的基因组序列及其比较公开于例如GenBank登录号U89790、J01901、AF043303和AF085716;Chiorini等人(1997)J.Virol 71:6823-33;Srivastava等人(1983)J.Virol.45:555-564;Chiorini等人(1999)J.Virol73:1309-1319;Rutledge等人(1998)J.Virol 72:309-319;以及Wu等人(2000)J.Virol 74:8635-8647中。

[0060] 在一些实施方案中,AAV衣壳蛋白是野生型AAV衣壳蛋白,包括但不限于AAV 1型(AAV1)、AAV 2型(AAV2)、AAV 3型(AAV3)、AAV 4型(AAV4)、AAV 5型(AAV5)、AAV 6型(AAV6)、AAV 7型(AAV7)、AAV 8型(AAV8)、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类动物AAV、非灵长类动物AAV、恒河猴AAV或绵羊AAV衣壳蛋白。在一些实施方案中,AAV衣壳蛋白是VP1、VP2或VP3衣壳蛋白。在一些实施方案中,AAV衣壳蛋白是多种AAV衣壳蛋白的杂合体。如本文所用的“变体AAV衣壳蛋白”是指AAV衣壳蛋白,其中AAV衣壳蛋白相对于相应亲本AAV衣壳蛋白包含至少一个氨基酸差异(例如,氨基酸取代、氨基酸插入、氨基酸缺失),其中所述AAV衣壳蛋白不对应于天然存在的AAV衣壳蛋白中存在的氨基酸序列。在各个方面,与包含亲本AAV衣壳蛋白的重组AAV病毒体的向性相比,变体AAV衣壳蛋白可以赋予重组AAV病毒体改变的向性。参见US2020/0338146,其以全文引用的方式并入本文。

[0061] 在一些实施方案中,AAV Rep蛋白是野生型AAV Rep蛋白,包括但不限于AAV 1型(AAV1)、AAV 2型(AAV2)、AAV 3型(AAV3)、AAV 4型(AAV4)、AAV 5型(AAV5)、AAV 6型(AAV6)、AAV 7型(AAV7)、AAV 8型(AAV8)、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类动物AAV、非灵长类动

物AAV、恒河猴AAV或绵羊AAV Rep蛋白。在一些实施方案中,AAV Rep蛋白选自包括Rep78蛋白、Rep68蛋白、Rep52蛋白和Rep40蛋白的组。在一些实施方案中,AAV Rep蛋白是多种AAV Rep蛋白的杂合体。如本文所用的"变体AAV Rep蛋白"是指AAV Rep蛋白,其中AAV Rep蛋白相对于相应亲本AAV Rep蛋白包含至少一个氨基酸差异(例如,氨基酸取代、氨基酸插入、氨基酸缺失),其中所述AAV Rep蛋白不对应于天然存在的AAV Rep蛋白中存在的氨基酸序列。

[0062] 如本文所用的"修饰的序列"是指与亲本序列的相应序列相比包含一个或多个取代、插入和/或缺失的序列。

[0063] AAV的"辅助病毒"是指允许AAV(例如,野生型AAV)被哺乳动物细胞复制和包装的病毒。用于AAV的多种此类辅助病毒是本领域已知的,包括腺病毒、疱疹病毒和痘病毒诸如牛痘病毒。腺病毒涵盖许多不同的亚组,尽管最常使用的是亚组C的5型腺病毒。人、非人哺乳动物和禽类来源的许多腺病毒是已知的,并且可从保藏中心诸如ATCC获得。疱疹家族病毒包括例如单纯疱疹病毒(HSV)和爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)以及巨细胞病毒(CMV)和伪狂犬病病毒(PRV)。

[0064] AAV需要辅助基因的表达才能有效复制。"辅助功能"是指在辅助病毒基因组中编码的允许AAV复制和包装(结合复制和包装的其他要求)的功能。如本文所述,"辅助功能"可以以多种方式提供,包括但不限于向生产者细胞提供辅助病毒或提供例如包含编码必需功能的多核苷酸序列的反式辅助质粒。必需功能包括但不限于由腺VA、E4和E2A基因提供的功能。例如,可以将包含编码一种或多种腺病毒辅助蛋白的核苷酸序列的质粒或其他表达载体转染或共转染到生产者细胞中。Cao等人2000J.Virol 74:11456-11463描述了使用辅助质粒生产高滴度、无野生型的重组AAV载体的方法。

[0065] "质粒"旨在指可以在细胞中独立复制的小的通常为环状的染色体外DNA分子。质粒可以包含一个或多个表达盒、开放阅读框、多核苷酸盒或表达载体。

[0066] 多核苷酸和细胞

[0067] 本文还提供了编码一种或多种AAV衣壳蛋白的多核苷酸。在特定实施方案中,多核苷酸是表达载体。在一些实施方案中,表达载体包含编码衣壳蛋白、修饰的衣壳蛋白或变体衣壳蛋白的多核苷酸,其与驱动多核苷酸在细胞中表达的启动子序列可操作地连接。在某些实施方案中,细胞是宿主细胞。宿主细胞可以用于产生包含衣壳蛋白的病毒体。"生产细胞"旨在指用于生产rAAV病毒体的宿主细胞。示例性宿主细胞包括哺乳动物细胞,包括但不限于HEK293细胞、HEK293衍生的细胞、VPC2.0细胞(HEK293衍生的细胞)和Oxford细胞(HEK293衍生的细胞)。在一些实施方案中,包含编码Cap的多核苷酸的多核苷酸还包含编码Rep的多核苷酸。在一些实施方案中,包含编码Rep的多核苷酸的多核苷酸与包含编码Cap的多核苷酸分开。

[0068] "启动子"是启动特定基因的转录的DNA区域。来自多种来源的启动子是本领域熟知的,并且本领域已知的任何启动子都可以用于本申请的方法和系统中。启动子可以是单向的(即,在一个方向上启动转录)或双向的(即,在3'或5'方向上启动转录)。启动子包括但不限于组成型活性启动子、诱导型启动子和细胞类型特异性启动子。组成型活性启动子包括但不限于人β肌动蛋白、鸡β肌动蛋白、巨细胞病毒(CMV)、SV40和CAG启动子。细胞类型特异性启动子包括但不限于CD19基因启动子、CaMKII1和UAS。诱导型启动子包括但不限于Tet系统(美国专利5464758和5814618)、蜕皮激素诱导型系统(No等人,(1996)Proc.Natl Acad

Sci 93:3346-3351)、Cre-Lox系统、T-Rex™系统(Invitrogen,Carlsbad CA)、Cre-ERT他莫昔芬诱导型重组酶系统(Indra等人(1999)Nuc Acid Res 27:4324-4327;美国专利7112715,Kramer和Fussenegger 2005Methods Mol Biol 308:123-144)和LacSwitch™系统(Stratagene San Diego CA)。

[0069] 在某些实施方案中,与Cap可操作地连接的启动子是组成型活性启动子。在一个方面,与Cap可操作地连接的启动子是CMV启动子。应当认识到,包含与Cap可操作地连接的CMV启动子的质粒还可以包含与Rep可操作地连接的启动子。在某些实施方案中,与Cap可操作地连接的启动子是p40启动子。

[0070] 在一些实施方案中,提供了包含编码基因产物(诸如但不限于治疗性基因产物)的序列的多核苷酸盒。在各个方面,多核苷酸盒的侧翼是一个或多个AAV反向末端重复序列(ITR)。在某些实施方案中,多核苷酸盒在5'和3'末端侧接AAV ITR。在一些实施方案中,所述一个或多个ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类动物AAV、非灵长类动物AAV、恒河猴AAV或绵羊AAV ITR或其变体。在一些实施方案中,所述一个或多个ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类动物AAV、非灵长类动物AAV、恒河猴AAV或绵羊AAV ITR。在一些实施方案中,所述一个或多个ITR是包含核苷酸的一个或多个插入、缺失和/或取代的AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类动物AAV、非灵长类动物AAV、恒河猴AAV或绵羊AAV ITR。ITR表达载体包含以下核酸元件中的一者或多者:第一ITR序列;启动子序列;内含子序列;第一UTR序列;编码基因产物的感兴趣的基因;第二UTR序列;聚A序列;以及第二ITR序列。在一些实施方案中,接头序列插入到两个或更多个核酸元件之间。在一些实施方案中,异源核酸编码治疗性多肽,例如编码阿柏西普(或其功能片段或功能变体)。

[0071] 术语"转基因"、"感兴趣的基因"和"编码基因产物的序列"可以互换使用。转基因的大小可能影响收获的rAAV的滴度,如本文下面所讨论的。不受机制所限制,调节或改变转基因大小可以增加收获的rAAV的滴度。转基因大小可以通过缺失基因产物的一个或多个部分而改变,或者通过添加一个或多个填充区而增加。填充区是具有选择以提高rAAV滴度的大小的多核苷酸序列,包括但不限于编码信号肽的多核苷酸序列或编码可切割序列的多核苷酸序列。

[0072] rAAV生产

[0073] 本领域已知许多用于生产重组AAV病毒体的方法,包括转染、稳定细胞系生产和感染性杂合病毒生产系统,其包括腺病毒-AAV杂合体、疱疹病毒-AAV杂合体和杆状病毒-AAV杂合体。用于生产rAAV病毒颗粒的rAAV生产培养物全部都需要1)合适的生产细胞,2)合适的辅助功能,3)AAV rep和cap基因;4)侧翼为至少一个AAV ITR序列的核酸(诸如编码转基因的序列)和5)支持rAAV生产的合适培养基和培养基组分。在一些实施方案中,合适的生产细胞是灵长类动物宿主细胞。在一些实施方案中,合适的宿主细胞是人来源的细胞系,诸如HeLa、a549、HEK293或Perc.6细胞。在优选的实施方案中,宿主细胞是HEK293衍生的细胞。在特别优选的实施方案中,宿主细胞是VPC2.0细胞。

[0074] 在当前的方法和系统中,在质粒构建体上提供合适的辅助功能。AAV辅助构建体包含多核苷酸,所述多核苷酸包含合适的辅助功能编码序列。合适的辅助功能编码序列可以

包括但不限于腺VA、E4和E2A辅助编码序列。

[0075] 在一些实施方案中,AAV rep基因可以来自任何AAV血清型或可以是修饰的AAV rep基因。在一些方面,AAV rep基因与rAAV载体基因组的ITR具有相同的血清型。在一些方面,AAV rep基因具有与rAAV载体基因组的ITR或Cap血清型不同的血清型。在一些方面,AAV Rep是嵌合Rep。在一些方面,AAV Cap是嵌合Cap。在三质粒系统和使用三种质粒的方法中,在同一质粒上提供Rep和Cap。在四质粒系统和使用四种质粒的方法中,在不同的质粒上提供Rep和Cap。

[0076] 本领域已知的合适培养基可以用于生产rAAV载体。这些培养基包括但不限于补充有4mM GlutaMAX的Gibco病毒生产培养基、由Hyclone Laboratories和JRH生产的培养基(包括改良伊格尔培养(Modified Eagle Medium,MEM)和杜尔贝科氏改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium,DMEM))。

[0077] 合适的rAAV生产培养基可以补充有0.5%-20%(v/v或w/v)水平的血清或血清衍生的重组蛋白。可替代地,rAAV病毒体可以在无血清条件下生产,所述无血清条件也可以被称为不含动物来源产物的培养基。设计用于支持rAAV病毒体生产的商业或定制培养基也可以补充有本领域已知的一种或多种细胞培养组分,包括但不限于葡萄糖、维生素、氨基酸和生长因子,以增加生产培养物中rAAV的滴度。

[0078] 本领域已知的任何转染试剂均可以用于本申请的方法和系统中。转染试剂可以包括但不限于磷酸钙、AAV-Max(也称为Trx)和PEI-Pro。术语"Trx"、"TRX"、"AAV-MAX"和"AAV-Max"可以互换使用。

[0079] "孵育"旨在指将转染的HEK293衍生的细胞保持在包括合适温度的条件下,使得细胞发育和增殖。孵育HEK293衍生细胞的方法是本领域已知的。转染的HEK293衍生细胞可以在含有试剂诸如一种或多种质粒对其赋予抗性的抗生素的培养基中孵育。转染的HEK293衍生细胞可以在含有多种选择性试剂的培养基中孵育。

[0080] rAAV生产培养物可以在适合于所利用的特定宿主细胞的各种条件(在宽温度范围内,持续不同的时间长度等)下生长。rAAV生产培养物包括附着依赖性培养物和附着非依赖性培养物。生产培养物可以在附着依赖性容器中培养,所述附着依赖性容器包括但不限于滚瓶、中空纤维过滤器、微载体、填充床生物反应器、流化床生物反应器,以及悬浮适应性容器,所述悬浮适应性容器包括但不限于旋转烧瓶、搅拌罐生物反应器和一次性系统(包括但不限于波袋系统)。

[0081] 本文还提供了包含通过本申请的方法或系统生产的rAAV的组合物。提供了包含通过本申请的方法或系统生产的rAAV的药物组合物。

[0082] 用于生产rAAV病毒体的一种方法是三重转染法。简言之,可以将含有Rep基因和Cap基因的质粒、连同辅助腺病毒质粒和包含侧翼为AAV ITR的转基因的质粒共转染到HEK293衍生细胞系中,孵育,并且收集和任选地纯化病毒体。转染和共转染方法是本领域已知的,包括但不限于磷酸钙转染。

[0083] "共转染"旨在涵盖多种质粒的并行转染、同时转染、接近并行转染、接近同时转染和快速顺序转染。三质粒系统的共转染具有挑战性。多于一种质粒的成功共转染可以以比单一质粒的成功转染更低的速率发生。成功共转染的挑战随着待转染质粒数量的增加而增加。不受机制所限制,共转染的挑战可以涉及质粒的转染效率、共转染细胞的选择和共转染

细胞内多个质粒的维持。在各个方面,转染质粒集的质粒顺序发生。

[0084] 本申请提供了用于生产rAAV的四质粒系统。简言之,可以将含有AAV Rep的第一质粒、含有AAV Cap的第二质粒、包含AAV辅助构建体的第三质粒和包含侧翼为AAV ITR的转基因的第四质粒转染到HEK293衍生细胞中,孵育转染的细胞,裂解转染的细胞,并且收获和任选地纯化rAAV。转染和共转染方法是本领域已知的,包括但不限于磷酸钙转染。

[0085] 认识到四质粒系统可以用于修饰的生产者细胞系方法中,诸如Martin等人(2013)Human Gene Therapy Methods 24:253-269;美国公开号US2004/0224411;以及Liu,等人(1999)Gene Ther.6:293-299中所描述的。简言之,在单独的质粒上提供Rep基因和Cap基因。应当理解,生产者细胞系可以含有Rep质粒、Cap质粒、或Rep质粒和单独的Cap质粒两者。在一些实施方案中,用质粒稳定地转染的细胞系维持质粒多次传代。质粒可以随着细胞复制而复制,或者质粒可以整合到细胞基因组中。

[0086] 在一些实施方案中,质粒可以含有允许选择维持质粒的细胞的选择标记(例如,抗生素抗性标记)。选择标记包括但不限于杀稻瘟菌素、G418、潮霉素B、博来霉素和嘌呤霉素。用于将核酸引入细胞中的方法是本领域已知的,并且包括但不限于病毒转导、阳离子转染、磷酸钙转染、显微注射、粒子轰击、电穿孔和纳米颗粒转染。参见例如Kim和Eberwine(2010)Anal Bioanal Chem 397:3173-3178。

[0087] 在包含三质粒方面和四质粒方面两者的系统和方法中,认识到质粒的摩尔比当归一化为大小时会影响过程产率。在各种实施方案中,质粒的摩尔比大致相等。在某些实施方案中,当归一化为大小时,质粒的摩尔比可以是大约1:1:1、1:2:1、1:3:1、1:1:2、2:1:1、1:4:1、1:4:2、2:1:1、2:1:2、3:2:1或1:2:3(辅助质粒:rep cap质粒:ITR质粒)。在某些实施方案中,质粒的摩尔比可以是大约1:1:1:1(辅助质粒:rep质粒:cap质粒:ITR质粒)。在各种实施方案中,当归一化为质粒大小时,Cap Rep质粒与辅助质粒或包含ITR表达载体的质粒的摩尔比在1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1、4.5:1、5:1或更大的范围内。在各种实施方案中,当归一化为质粒大小时,Cap质粒(第二质粒)与辅助质粒(第三质粒)或包含ITR表达载体的质粒(第四质粒)的摩尔比在1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1、4.5:1、5:1或更大的范围内。在各种实施方案中,当归一化为质粒大小时,Rep质粒(第一质粒)与辅助质粒(第三质粒)或包含ITR表达载体的质粒(第四质粒)的摩尔比在约1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1、4.5:1、5:1或更大的范围内。在各种实施方案中,当归一化为质粒大小时,Rep质粒(第一质粒)与Cap质粒(第二质粒)的摩尔比在大约0.5:1、1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1、4.5:1、5:1、1:5、1:4.5、1:4、1:3.5、1:3、1:2.5、1:2、1:1.5、1:1和1:0.5的范围内。

[0088] 术语“收获”和“收集”可以互换使用。收获病毒体、病毒颗粒和rAAV的方法是本领域已知的,并且可以包括但不限于过滤、流动过滤、深度过滤、膜过滤、离心及其组合。本领域已知的任何收获rAAV的方法均可以用于本申请的方法和系统中。

[0089] 眼部疾病和病症是本领域已知的。眼部疾病和病症包括但不限于全色盲、青光眼、视网膜色素变性、黄斑变性、视网膜劈裂症、莱伯氏先天性黑矇、糖尿病性视网膜病变、色盲、糖尿病性黄斑水肿、脉络膜新生血管形成、增生性糖尿病性视网膜病变、视网膜静脉阻塞、视网膜中心静脉阻塞、视网膜分支静脉阻塞、糖尿病性黄斑水肿、糖尿病性视网膜缺血、缺血性视网膜病变、糖尿病性视网膜水肿。黄斑变性可以包括但不限于干性黄斑变性、湿性

黄斑变性、年龄相关性黄斑变性和急性黄斑变性。

[0090] 年龄相关性黄斑变性(AMD)是一种影响黄斑的退行性眼部疾病,黄斑是视网膜中心负责阅读和高敏锐度的光敏感小区域。影响黄斑的情况会降低中心视力,同时保持周边视力完整。在严重的情况下,所述疾病可能导致中心失明。AMD是美国人群中65岁及以上人群视力丧失的显著原因,并且任何AMD在40岁以上年龄人群中的患病率估计为大约6.5%(Klein等人,(2011)Arch Ophthalmol,129(1):75-80)。

[0091] 年龄相关性黄斑变性有两种形式,干性(萎缩性)和湿性黄斑变性。干性AMD比湿性AMD更常见,但干性AMD可能进展为湿性AMD。干性AMD的特征在于随着细胞消失,黄斑组织变薄;干性AMD可能影响双眼。干性AMD的典型特征在于视网膜色素上皮(RPE)层中细胞(上覆光感受器细胞)的进行性凋亡,并且经常还有脉络膜毛细血管层中下层细胞的进行性凋亡。伴有上覆光感受器萎缩的RPE细胞死亡的汇合区域被称为地理萎缩(GA)。随着干性AMD进展和GA增加,中心视力慢慢恶化,并且逐渐丧失看到精细细节的能力。干性AMD倾向于比湿性AMD进展更慢。

[0092] 在一些实施方案中,眼部新生血管疾病是复发性和/或持续性wAMD。在一些实施方案中,眼部新生血管疾病是继发于AMD的活动性中心凹下CNV。在一些实施方案中,继发于AMD的活动性中心凹下CNV占据总病变大小的≥50%。在一些实施方案中,继发于AMD的活动性中心凹下CNV占据总病变大小的≥50%,证据包括在荧光素血管造影片(FA)上有渗漏、在光谱域光学相干断层扫描(SD-OCT)上有流体和/或在彩色眼底摄影上有视网膜下出血。在一些实施方案中,继发于AMD的活动性中心凹下CNV占据总病变大小的≥50%,证据包括在荧光素血管造影片(FA)上有渗漏、在光谱域光学相干断层扫描(SD-OCT)上有流体和/或在彩色眼底摄影上有视网膜下出血,并且病变的整个尺寸不超过12个黄斑光凝研究盘区域。在一些实施方案中,在施用单位剂量的本公开rAAV颗粒之前,个体的一只眼睛和/或对侧眼睛表现出基于78-25(例如,小于约78、约75、约70、约65、约60、约55、约50、约45、约40、约35、约30或约25中的任一者)的ETDRS字母评估的最佳矫正视力(BCVA)。在一些实施方案中,在施用单位剂量的本公开rAAV颗粒之前,个体的一只眼睛和/或对侧眼睛表现出基于大于约5、约10、约15、约20、约25、约30、约35、约40、约45、约50、约55、约60、约65、约70、约75、约80、约85、约90、约95或约100中的任一者的ETDRS字母评估的最佳矫正视力(BCVA)。

[0093] 在一些实施方案中,在施用单位剂量的rAAV颗粒之前,个体在一只眼睛和/或对侧眼睛中具有息肉样脉络膜血管病变(PCV)。

[0094] 全色盲是一种罕见的常染色体隐性疾病,其导致视网膜变性,影响所有三种类型的视锥光感受器细胞,导致视力下降、畏光、昼盲和颜色辨别严重丧失。在CNGB3基因中的突变占患者的大于90%,导致完全性全色盲,这意味着他们在颜色辨别和中心视力方面有显著损害。

[0095] 在一些实施方案中,单位剂量的rAAV颗粒与类固醇治疗组合施用。在一些实施方案中,类固醇治疗是皮质类固醇治疗。在一些实施方案中,类固醇治疗是系统性类固醇治疗。在一些实施方案中,类固醇治疗是口服类固醇治疗。在一些实施方案中,类固醇治疗是泼尼松治疗。在一些实施方案中,类固醇治疗是眼用类固醇治疗。在一些实施方案中,眼用类固醇治疗是局部类固醇治疗(例如,滴剂)、眼周类固醇治疗(例如,眼球筋膜下(subtenons)、结膜下)、玻璃体内类固醇治疗或脉络膜上类固醇治疗。在一些实施方案中,

眼用类固醇治疗是糖皮质激素,包括但不限于抗炎性糖皮质激素。在一些实施方案中,局部类固醇治疗是糖皮质激素,包括但不限于抗炎性糖皮质激素。在一些实施方案中,局部类固醇治疗是二氟泼尼酯治疗、甲羟松治疗、氯替泼诺治疗、泼尼松龙治疗、氟轻松治疗、曲安西龙治疗、利美索龙治疗、地塞米松治疗、氟米龙治疗、氟轻松治疗、利美索龙治疗或泼尼松治疗。抗炎性糖皮质激素可以包括但不限于二氟泼尼酯、地塞米松、泼尼松龙、曲安西龙、氟米龙、利美索龙、氟轻松、氯替泼诺及其生物等效物。在一些实施方案中,局部类固醇治疗是二氟泼尼酯治疗。"地塞米松"旨在指地塞米松、地塞米松生物类似物、地塞米松生物等效物、以及包含地塞米松、地塞米松生物类似物或地塞米松生物等效物的药物组合物。包含地塞米松的药物组合物包括但不限于Ozurdex™、Maxidex™、Decadron™、地塞米松Intensol™、Ocu-Dex™、Dexycu™、Dextenza™和Zodex™。Ozurdex™是一种包含地塞米松的药物组合物。"二氟泼尼酯"旨在指二氟泼尼酯、二氟泼尼酯生物类似物、二氟泼尼酯生物等效物、以及包含二氟泼尼酯、二氟泼尼酯生物类似物或二氟泼尼酯生物等效物的药物组合物。包含二氟泼尼酯的药物组合物包括但不限于Durezol™和二氟泼尼酯乳剂。"曲安西龙"旨在指曲安西龙、曲安西龙生物类似物、曲安西龙生物等效物、以及包含曲安西龙、曲安西龙生物类似物或曲安西龙生物等效物的药物组合物。包含曲安西龙的药物组合物包括但不限于Triesence™、Xipere™和Trivaris™。在一些实施方案中,在施用单位剂量的rAAV颗粒之前、期间和/或之后施用类固醇治疗。在一些实施方案中,在施用单位剂量的rAAV颗粒之前施用类固醇治疗。在一些实施方案中,在施用单位剂量的rAAV颗粒期间施用类固醇治疗。在一些实施方案中,在施用单位剂量的rAAV颗粒之后施用类固醇治疗。在一些实施方案中,在施用单位剂量的rAAV颗粒之前和期间施用类固醇治疗。在一些实施方案中,在施用单位剂量的rAAV颗粒之前和之后施用类固醇治疗。在一些实施方案中,在施用单位剂量的rAAV颗粒期间和之后施用类固醇治疗。在一些实施方案中,在施用单位剂量的rAAV颗粒之前、期间和之后施用类固醇治疗。

[0096] 在一些实施方案中,类固醇治疗是眼用类固醇治疗(例如,二氟泼尼酯)。在一些实施方案中,眼用类固醇治疗(例如,二氟泼尼酯)是每日类固醇治疗,从施用单位剂量的rAAV颗粒起至多约4周、约6周或约8周。在一些实施方案中,眼用类固醇治疗包括在约第1周施用约四次眼用类固醇,在约第2周施用约三次眼用类固醇,在约第3周施用约两次眼用类固醇,和在约第4周施用约一次眼用类固醇;从施用单位剂量的rAAV颗粒开始和在其之后计时。在一些实施方案中,眼用类固醇是约0.005%至约0.5%的二氟泼尼酯。在一些实施方案中,眼用类固醇是约0.005%、约0.006%、约0.007%、约0.008%、约0.009%、约0.01%、约0.02%、约0.03%、约0.4%、约0.05%、约0.06%、约0.07%、约0.08%、约0.09%或约0.1%的二氟泼尼酯中的任一者。在一些实施方案中,眼用类固醇是0.05%二氟泼尼酯。在一些实施方案中,0.05%二氟泼尼酯的剂量是一滴眼用溶液。在一些实施方案中,一滴为约50μl(例如,约25μl至约50μl、约50μl至约100μl)。在一些实施方案中,二氟泼尼酯的剂量包含约1μg至约5μg、或约2μg至约3μg、或约2.5μg二氟泼尼酯。在一些实施方案中,二氟泼尼酯的剂量包含约2.5μg二氟泼尼酯。

[0097] 在一些实施方案中,类固醇治疗是眼用类固醇治疗(例如,二氟泼尼酯)。在一些实施方案中,眼用类固醇治疗(例如,二氟泼尼酯)是每日局部类固醇治疗,从施用单位剂量的rAAV颗粒起至多约4周、约6周或约8周。在一些实施方案中,局部类固醇治疗包括在约第1周

施用约四次局部类固醇,在约第2周施用约三次局部类固醇,在约第3周施用约两次局部类固醇,和在约第4周施用约一次局部类固醇;从施用单位剂量的rAAV颗粒开始和在其之后计时。在一些实施方案中,局部类固醇治疗包括在施用单位剂量的rAAV颗粒之后每天施用约四次局部类固醇(即QID)持续约3周,随后每天施用约3次局部类固醇(即TID)持续约1周,随后每天施用约2次局部类固醇(即BID)持续约1周,并且随后每天施用约1次局部类固醇(即QD)持续约1周。在一些实施方案中,局部类固醇包含0.05%二氟泼尼酯,剂量为约1μg至约3μg。在一些实施方案中,局部类固醇包含0.05%二氟泼尼酯,剂量为约2.5μg。在一些实施方案中,局部类固醇是约0.005%至约0.5%的二氟泼尼酯。在一些实施方案中,局部类固醇是约0.005%、约0.006%、约0.007%、约0.008%、约0.009%、约0.01%、约0.02%、约0.03%、约0.04%、约0.05%、约0.06%、约0.07%、约0.08%、约0.09%或约0.1%的二氟泼尼酯中的任一者。在一些实施方案中,局部类固醇是0.05%二氟泼尼酯。在一些实施方案中,0.05%二氟泼尼酯的剂量是一滴眼用溶液。在一些实施方案中,一滴为约50μl(例如,约25μl至约50μl、约50μl至约100μl)。在一些实施方案中,二氟泼尼酯的剂量包含约1μg至约5μg、或约2μg至约3μg、或约2.5μg二氟泼尼酯。在一些实施方案中,二氟泼尼酯的剂量包含约2.5μg二氟泼尼酯。

[0098] 应当理解,对以下实施例的引用仅用于说明目的,并不限制权利要求的范围。

[0099] 实施例

[0100] 实施例1. HEK衍生细胞中的AAV产生

[0101] 使细胞生长至大约4.5至6.0×10^6个活细胞/mL的密度。在进行转染之前,确认活力≥95%。将细胞稀释在补充有GlutaMax™补充剂(ThermoFisher)的培养基中。稀释后立即将AAV-Max或PEI-Pro添加到稀释的细胞溶液中。轻轻旋转烧瓶以混合细胞。将细胞在轨道上在具有8% CO_2的潮湿气氛的37℃培养箱中孵育,直到DNA/转染复合过程完成。制备转移质粒、Rep和Cap质粒(或多个质粒)以及辅助质粒DNA。质粒DNA摩尔比基于质粒大小优化,并且使用待转染的培养体积的大约1.5μg/mL总质粒DNA。

[0102] 如下文所述制备转染复合物。轻轻混合转染试剂。用复合缓冲液稀释总质粒DNA。将稀释的DNA在室温(RT)下孵育10分钟。将转染增强剂和转染试剂轻轻混合并在室温下一起孵育10分钟。将预混合的加强剂和试剂与稀释的质粒DNA轻轻混合,并在室温下孵育20分钟至25分钟。将质粒、加强剂和试剂组合轻轻地添加到细胞的振荡器中。将细胞在轨道振荡器上在具有8% CO2的潮湿气氛的37℃培养箱中孵育大约72小时。图5中提供了两种细胞类型中的一般过程的卡通示意图。

[0103] 实施例2.VPC2.0细胞中的AAV产生

[0104] 在转染当天(第0天),确定Gibco VPC2.0细胞(ThermoFisher目录号A49784)的活细胞密度和活力百分比。将密度为大约4.5至6.0×10^6个活细胞/mL且活力≥95%的细胞进行转染。用补充有4mM GlutaMAX™补充剂的新鲜病毒生产培养基将细胞稀释至3×10^6个活细胞/mL的最终密度。稀释后立即添加AAV-MAX。将烧瓶轻轻旋转以混合细胞,并且置于轨道上具有8% CO_2的潮湿气氛的37℃培养箱中,直到DNA/转染复合过程完成。

[0105] 对于三质粒系统,使用基于质粒大小的摩尔比优化混合转移质粒DNA、Rep/Cap质粒DNA和辅助质粒DNA。制备待转染的培养体积的大约1.5μg/mL总质粒DNA。如所述制备转染复合物。通过轻轻倒置混合AAV-MAX转染试剂瓶。用病毒-Plex™复合缓冲液将总质粒DNA稀

释至待转染的培养体积的10％的最终体积。将质粒DNA和复合缓冲液轻轻混合并在室温下孵育10分钟。

[0106] 将未稀释的AAV-MAX转染增强剂(3μL/mL待转染培养物)和随后AAV-MAX转染试剂(6μL/mL待转染培养物)添加到新管中。将加强剂和试剂轻轻混合并在RT下孵育10分钟。将混合的AAV-MAX转染加强剂和AAV-MAX转染试剂添加到稀释的质粒DNA中并轻轻混合。将质粒DNA/AAV-MAX加强剂/AAV-MAX试剂复合物在室温下孵育20分钟至25分钟,然后轻轻地转移到摇瓶中的细胞溶液中。将细胞在轨道振荡器上在具有8％ CO2的潮湿气氛的37℃培养箱中孵育大约72小时。

[0107] 实施例3收获

[0108] 转染后70小时至72小时收获AAV颗粒。将AAV-MAX裂解缓冲液以1:10稀释度直接添加到培养烧瓶中。旋转烧瓶以均匀分布裂解缓冲液。在培养物中添加1M MgCl2至最终浓度为2mM-4mM。向烧瓶中添加90U/mL全能核酸酶(Benzonase)。将烧瓶在轨道振荡器上于37℃孵育至少2小时。将细胞在4200RPM、4℃下旋转30分钟,并且将上清液转移到适当尺寸的容器中,并在-80℃下储存。

[0109] 实施例4.通过冷冻/解冻或超声处理收获

[0110] 计数细胞以确定VCD、TCD和活力％。将细胞收集在适当尺寸的容器中,并且在3500RPM、4℃下离心10分钟。丢弃上清液。将细胞沉淀以(约1mL/2.8E+7个细胞)重悬于裂解缓冲液(0.15M NaCl,50mM Tris-Cl,0.05％ Tween-20;pH 8)中。将细胞进行三轮冻融循环或超声处理(大约100ml批次)。添加$MgCL_2$至2mM。将裂解物用全能核酸酶(50ul/ml)处理1小时。将细胞在4200RPM、4℃下旋转30分钟。将上清液转移到适当尺寸的容器中并在4℃或-80℃下储存。

[0111] 当使用超声处理时,在超声处理之前和之后将重悬的细胞在冰上冷却。使用具有扁平尖端的Branson 250数字超声仪,振幅50％,1秒脉冲开/关40秒。

[0112] 实施例5.转染试剂的评价

[0113] 将以归一化为质粒大小的1:2:0.5摩尔比的pAAV ITR-表达载体、pAAV Rep-Cap基因和pHelper分别以用PEIpro®或TRX(AAV-MAX转染试剂)转染试剂共转染到Oxford或VPC2.0细胞中。从细胞收获rAAV2.7m8-Fluc,并且通过如本文别处所述的ddPCR确定滴度。图1中呈现了一个这样的系列实验的结果。

[0114] 实施例6.滴度确定

[0115] 使用ddPCR确定滴度。通过具有0.05％ Pluronic F-68(Gibco,Invitrogen,Grand Island,NY)的稀释缓冲液将消化的收获的rAAV稀释1/5000倍。使用用于残留DNA检测试剂盒(BIO-RAD,Hercules,CA)的ddPCR™Supermix与0.9μM引物和0.1μM探针组装反应混合物,最终体积为25μL,如制造商的方案中所述。如ddPCR扩增指南(Bio-Rad 6407)中所述进行ddPCR。然后,根据制造商的说明书,使用QX-100液滴发生器(BIO-RAD)用液滴发生器油乳化测试样品。使用具有以下参数的常规热循环仪进行液滴的PCR扩增:95℃持续10分钟,然后39个循环的94℃持续30秒和60℃持续30秒,最后98℃热处理10分钟。随后使用QX200液滴阅读器(BIO-RAD)扫描PCR板,并且使用QuantaSoft软件(BIO-RAD)分析数据。对于2D ddPCR,将分别用5(6)-羧基荧光素(FAM)和六氯荧光素(HEX)标记的两组引物和探针添加到每个反应混合物中,并且在同一管中进行ddPCR。

[0116] 实施例7.裂解条件评估

[0117] 评估了各种裂解条件。用PEIpro®转染试剂在Oxford细胞中产生rAAV2.7m8-CMV-Fluc衣壳。用不同的裂解条件裂解含有rAAV的Oxford细胞:冻融(FT)、超声处理(SC)、热化学方法(Thermo)和替代化学方法(Alt)。替代化学方法缓冲液是10mM EDTA、20mM TRIS-碱(pH 9.2)、全能核酸酶10u/ml、MgSO4.7H2o 40mM和0.4M NaCl。图2中汇总了一个这样的系列实验的结果。

[0118] 实施例8.质粒摩尔比优化

[0119] 通过pAAV ITR表达载体、pAAV Rep-Cap基因和pHelper分别以归一化为质粒大小的不同摩尔比共转染,在VPC2.0细胞中产生rAAV2.7m8-Dry AMD。图3中汇总了一个这样的系列实验的结果。

[0120] 实施例9.转基因的影响

[0121] 产生具有插入到具有两种不同信号肽(886和1176)的相同骨架中的相同转基因的rAAV,并且确定收获的rAAV的滴度。p886具有IgK信号序列(MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC,SEQ ID NO:1),然而p1176具有CD33信号序列(MPLLLLLPLLWAGALA,SEQ ID NO:2)。用两种不同的转染试剂(PEIpro®和TRX)在Oxford和VPC2.0细胞中产生rAAV2.7m8-Dry AMD(886和1176)。图4中汇总了一个这样的系列实验的结果。

[0122] 实施例10.四质粒系统和三质粒系统的比较

[0123] 用两种不同的转染系统在VPC2.0细胞中产生rAAV2.7m8-CMV-GFP。第一个条件是通过共转染pAAV ITR表达载体、pAAV Rep-Cap基因和pHelper的常规三质粒系统。第二个条件是四质粒系统。将pAAV Rep-Cap基因分成两个单独的质粒(pAAV-Rep基因质粒和pAA V-CMV-Cap基因质粒),其中CMV启动子用于Cap基因。如本文别处所述,将pAAV ITR表达载体、pAAV Rep基因、pAAV-CMV-Ca p基因和pHelper共转染到VPC2.0细胞中。孵育转染的细胞。收获rAAV2.7m8-CMV-GFP颗粒并通过ddPCR确定滴度。图6中汇总了一个这样的系列实验的结果。

[0124] 令人惊讶的是,四质粒系统方法显著增加了rAAV滴度。在至少一系列实验中,当使用四质粒系统时,rAAV2.7m8-CMV-GFP滴度增加超过五倍。

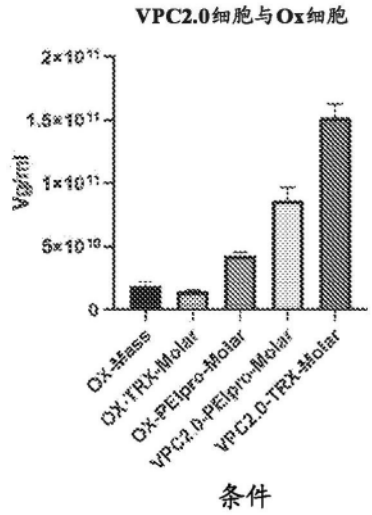

VPC2.0细胞与Ox细胞
2×10^11
1.5×10^11
1×10^11
5×10^10
0
vg/ml
OX-Mass
OX-TRX-Molar
OX-PEIpro-Molar
VPC2.0-PEIpro-Molar
VPC2.0-TRX-Molar
条件

图1

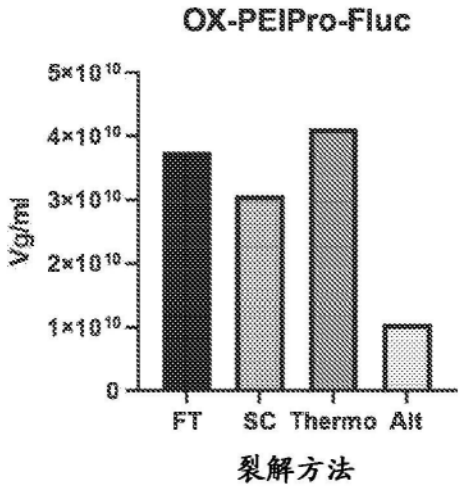

OX-PEIPro-Fluc
5×10^10
4×10^10
3×10^10
2×10^10
1×10^10
0
vg/ml
FT
SC
Thermo
Alt
裂解方法

图2

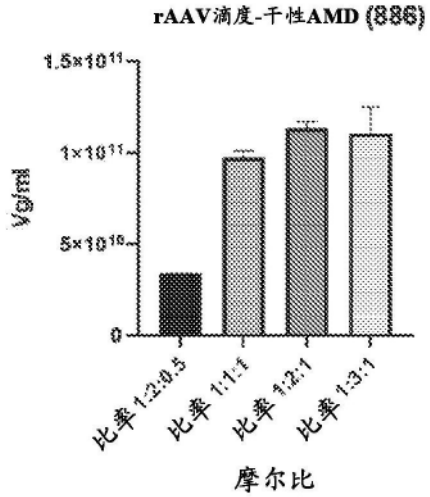

rAAV滴度-干性AMD (886)
1.5×10^11
1×10^11
5×10^10
0
Vg/ml
比率1:2:0.5
比率1:1:1
比率1:2:1
比率1:3:1
摩尔比

图3

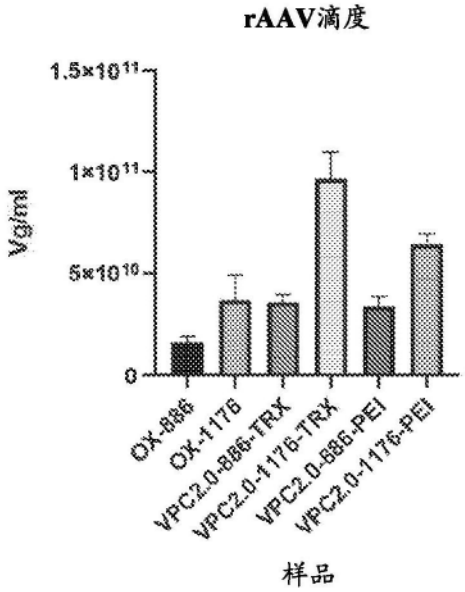

rAAV滴度
1.5×10^11
1×10^11
5×10^10
0
Vg/ml
OX-886
OX-1176
VPC2.0-886-TRX
VPC2.0-1176-TRX
VPC2.0-886-PEI
VPC2.0-1176-PEI
样品

图4

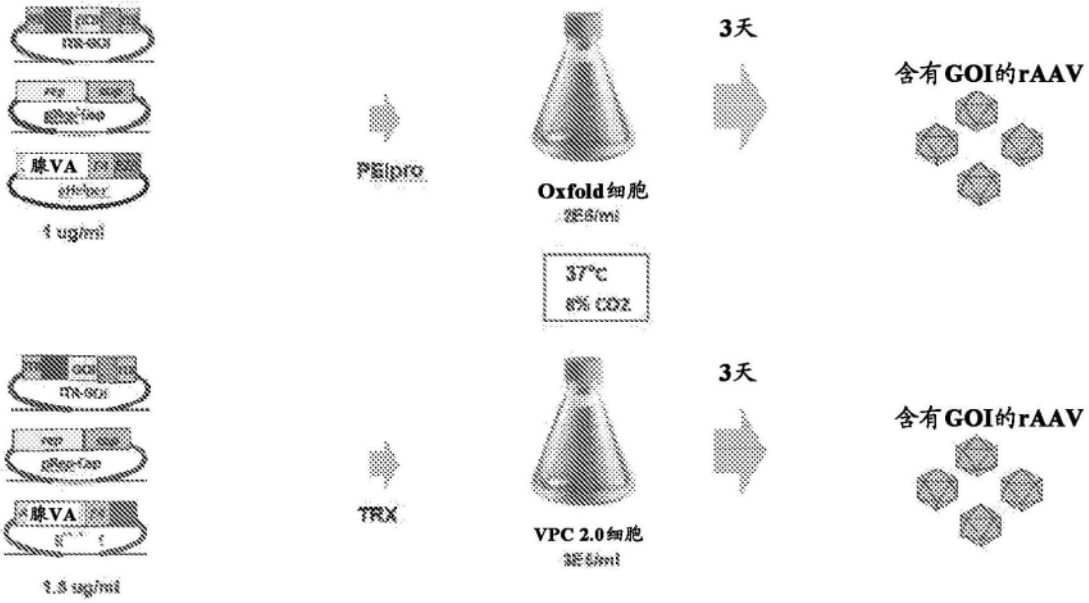

腺VA
1 ug/ml
PEIpro
Oxfold细胞
3天
含有GOI的rAAV
37°C
8% CO2
腺VA
1.8 ug/ml
TRX
VPC 2.0细胞
3天
含有GOI的rAAV

图5

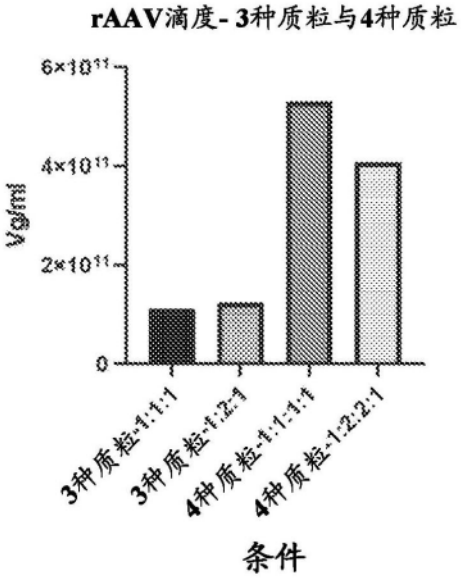

rAAV滴度- 3种质粒与4种质粒
6×10^11
4×10^11
2×10^11
0
Vg/ml
3种质粒-1:1:1
3种质粒-1:2:1
4种质粒-1:1:1:1
4种质粒-1:2:2:1
条件

图6

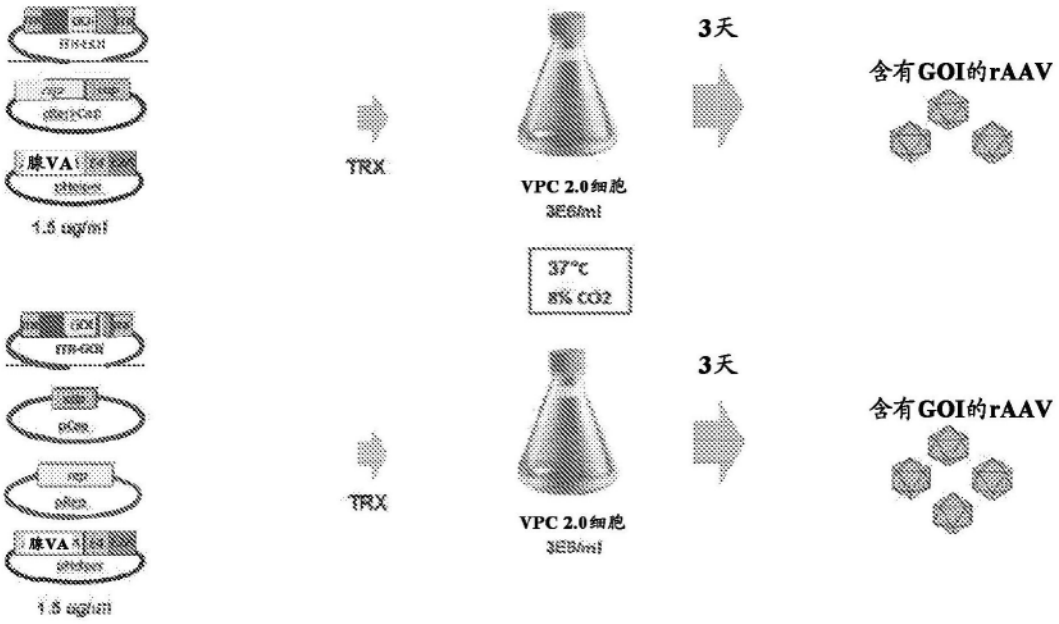

腺VA
1.5 ug/ml
TRX
VPC 2.0细胞
3E6/ml
37°C
8% CO2
3天
含有GOI的rAAV
腺VA
1.5 ug/ml
TRX
VPC 2.0细胞
3E6/ml
3天
含有GOI的rAAV

图7