

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202392710** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2023.12.29**

(51) Int. Cl. **G01N 33/68** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2019.10.24**

---

(54) **СПОСОБЫ АНАЛИЗА КОМПОЗИЦИИ ВИРУСНОГО КАПСИДНОГО БЕЛКА**

---

(31) **62/750,583**

(72) Изобретатель:

(32) **2018.10.25**

**Ванг Шунхай (US)**

(33) **US**

(62) **202191137; 2019.10.24**

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

**РИДЖЕНЕРОН**

**ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

---

(57) Описаны способы определения стехиометрии вирусного капсида и/или определения гетерогенности белковых компонентов в вирусном капсиде.

**A1**

**202392710**

**202392710**

**A1**

## **СПОСОБЫ АНАЛИЗА КОМПОЗИЦИИ ВИРУСНОГО КАПСИДНОГО БЕЛКА**

### **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

В заявке испрашивается приоритет согласно 35 USC §119(e) по предварительной патентной заявке США № 62/750583, поданной 25 октября 2018 года, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме и для всех целей.

### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

[001] Настоящее изобретение относится к способам определения гетерогенности вирусной частицы, такой как частица аденоассоциированного вируса (adeno-associated virus - AAV), с применением жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия (hydrophilic interaction liquid chromatography - HILIC) и масс-спектрометрического определения.

### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

[002] Генная терапия появилась как альтернативный способ лечения генетических заболеваний. Генная терапия включает перенос определенного генетического материала (ДНК, РНК или олигонуклеотидов) в клетки-мишени. На практике, ген, представляющий интерес (также называемый трансгеном), должен быть доставлен в клетку с помощью вектора, который несет молекулу ДНК или РНК. Этот процесс основан на передаче функциональных генов для замены или дополнения дефектных генов. Трансген может быть доставлен в клетку с помощью вектора. Способ доставки различается в зависимости от типа лечения и органа/ткани, на которые нацелено воздействие.

[003] Вирусные частицы начали применять в качестве векторов для генной терапии и лечения заболеваний. Вирусные векторы, например, на основе генома аденоассоциированного вируса (AAV), предлагают перспективные платформы для доставки генов. В настоящее время описано 12 человеческих серотипов AAV (AAV1-12), многие из которых обладают различным клеточным и тканевым тропизмом, что потенциально создает возможность для создания множества различных классов векторов из этого вирусного рода.

[004] Однако одна из проблем, с которыми сталкиваются при внедрении вирусных векторов в генную терапию, - это характеристика однородности вирусных частиц. Хотя с помощью классических методов, также как электронная микроскопия и саузерн-блоттинг, можно охарактеризовать гетерогенность вирусных частиц, например, гетерогенность и агрегацию AAV, указанные методы не обеспечивают достаточного разрешения для количественной оценки гомогенности, когда дело доходит до продуцирования препаратов вирусных векторов для клинического применения. Для обеспечения качества и согласованности продукта настоятельно рекомендуется осуществлять полную характеристику составляющих вирусных капсидных белков, таких как капсидные белки векторов AAV, включая их последовательности и посттрансляционные модификации (PTM). Таким образом, существует необходимость в разработке способов для определения однородности вирусных частиц.

## КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[005] В одном аспекте настоящего изобретения предлагается способ определения стехиометрии белковых компонентов вирусного капсида вирусной частицы, при этом указанный способ включает: (a) подвергание образца вирусных частиц жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия (HILIC) для разделения белковых компонентов вирусного капсида вирусных частиц; (b) определение масс белковых компонентов вирусного капсида для идентификации белковых компонентов, разделенных с помощью HILIC; и (c) определение относительного количества белковых компонентов вирусного капсида из разделения HILIC, тем самым определяя стехиометрию белковых компонентов вирусного капсида вирусной частицы.

[006] В другом аспекте настоящего изобретения предлагается способ определения гетерогенности белков в капсиде вирусной частицы, при этом указанный способ включает: (a) подвергание вирусной частицы HILIC для разделения белковых компонентов капсида вирусных частиц; (b) определение масс белковых компонентов белкового капсида; и (c) сравнение определенных масс белковых компонентов капсида вирусных частиц с теоретическими массами, при этом отклонение одной или более масс белковых компонентов капсида вирусных частиц от теоретических масс указывает на гетерогенность капсида.

[007] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вирусная частица содержит частицу аденоассоциированного вируса (AAV).

[008] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения белковые компоненты вирусного капсида содержат VP1, VP2 и VP3 частицы AAV.

[009] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерогенность включает один или более смешанных серотипов, вариантных капсидов, аминокислотных замен капсидов, усеченных капсидов или модифицированных капсидов.

[0010] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения частица AAV содержит капсид AAV1, капсид AAV2, капсид AAV3, капсид AAV4, капсид AAV5, капсид AAV6, капсид AAV7, капсид AAV8, капсид AAVrh8, капсид AAV9, капсид AAV10, капсид AAV11, капсид AAV 12 или их вариант.

[0011] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения массы VP1, VP2 и VP3 сравнивают с теоретическими массами одного или более из следующих капсидов: капсида AAV1, капсида AAV2, капсида AAV3, капсида AAV4, капсида AAV5, капсида AAV6, капсида AAV7, капсида AAV8, капсида AAVrh8, капсида AAV9, капсида AAV10, капсида AAV11, капсида AAV 12 или их варианта.

[0012] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения частица AAV содержит последовательность AAV1 инвертированных терминальных повторов (inverted terminal repeat - ITR), AAV2 ITR, AAV3 ITR, AAV4 ITR, AAV5 ITR, AAV6 ITR, AAV7 ITR, AAV8 ITR, AAVrh8 ITR, AAV9 ITR, AAV 10 ITR, AAVrh10 ITR, AAV11 ITR или AAV 12 ITR.

[0013] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения частица AAV имеет серотип капсида, выбранный для трансдукции клеток печени субъекта.

[0014] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения частица AAV представляет собой рекомбинантную частицу AAV (rAAV).

[0015] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения частица AAV содержит вектор AAV, кодирующий гетерологичный трансген.

[0016] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения частица AAV имеет капсидный серотип AAV7, AAV8 или AAV9.

[0017] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения частица AAV имеет капсидный серотип AAV9.

[0018] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения частица AAV имеет капсидный серотип AAV9 и представляет собой вирусный вектор, кодирующий лизосомальную альфа-глюкозидазу (GAA), связанную с антителом анти-CD63.

[0019] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вирусная частица содержит вирусный вектор, кодирующий гетерологичный трансген.

[0020] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вирусная частица принадлежит к семейству вирусов, выбранных из группы, состоящей из Adenoviridae, Parvoviridae, Retroviridae, Baculoviridae и Herpesviridae.

[0021] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вирусная частица принадлежит к роду вирусов, выбранному из группы, состоящей из атаденовируса, авиаденовируса, ихтаденовируса, мастаденовируса, сиаденовируса, амбиденсовируса, бревиденсовируса, гепанденсовируса, итеранденсовируса, пенстилденсовируса, амдопарвовируса, авепарвовируса, бокапарвовируса, коппарвовируса, депендопарвовируса, эритропарвовируса, протопарвовируса, тетрапарвовируса, альфаретровируса, бетаретровируса, дельтаретровируса, эpsilonретровируса, гаммаретровируса, лентивируса, спумавируса, альфабакуловируса, бетабакуловируса, дельтабакуловируса, гаммабакуловируса, илтоввируса, мардивируса, симплексвируса, варицелловируса, цитомегаловируса, муромегаловируса, пробосцивируса, розеоловируса, лимфокриптовируса, макавируса, перкавируса и радиновируса.

[0022] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Retroviridae представляет собой вирус саркомы мышей Молони (MoMSV), вирус саркомы мышей Харви (HaMuSV), вирус опухоли молочной железы мышей (MuMTV), вирус лейкоза обезьян гиббонов (GaLV), вирус лейкоза кошек (FLV), спумавирус, вирус Фрэндр, вирус стволовых клеток мыши (MSCV), вирус саркомы Рауса (RSV), вирусы Т-клеточного лейкоза человека, вирус иммунодефицита человека (HIV), вирус иммунодефицита кошек (FIV), вирус иммунодефицита лошадей (EIV), вирус висна-маэди; вирус артрита-энцефалита коз; вирус инфекционной анемии лошадей; вирус иммунодефицита кошек

(FIV); вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV); или вирус иммунодефицита обезьян (SIV).

[0023] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения HPLC использует подвижную фазу А, содержащую трифторуксусную кислоту в воде.

[0024] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения подвижная фаза А содержит около 0,1% трифторуксусной кислоты.

[0025] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения хроматография включает подвижную фазу В, содержащую трифторуксусную кислоту в ацетонитриле.

[0026] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения подвижная фаза В содержит около 0,1% трифторуксусной кислоты.

[0027] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения доля подвижной фазы А в хроматографии со временем увеличивается.

[0028] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения подвижная фаза А увеличивается от около 15% до около 100% в течение около 45 минут.

#### ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0029] На Фиг.1 представлена схематическая модель возможной схемы лечения болезни Помпе, которая включает применение аденоассоциированного вируса (AAV) в качестве вектора для генной терапии.

[0030] На Фиг. 2А представлена модель вирусного капсида AAV.

[0031] На Фиг. 2В схематически представлены вирусные капсидные белки серотипа AAV и их приблизительные массы.

[0032] Фиг. 3А представляет собой УФ-кривую от обращенно-фазового ТС-разделения капсидных белков AAV от частицы AAV, демонстрирующую низкое разрешение отдельных белков.

[0033] На Фиг. 3В представлено сравнение нескольких методов разделения предшествующего уровня техники, демонстрирующее как низкое разрешение, так и/или низкую количественную оценку.

[0034] Фиг. 4 представляет собой УФ-кривую разделения капсидных белков AAV и частицы AAV с помощью жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия (HPLC), демонстрирующую высокое разрешение отдельных белков и определение относительного содержания отдельных белков.

[0035] Фиг. 5А-5D представляют собой масс-спектры капсидных белков AAV от частицы AAV.

[0036] На Фиг. 6 продемонстрированы две кривые HPLC-УФ-анализа вирусных частиц AAV9 и определение их стехиометрии.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0037] Перед тем как продолжить описание настоящего изобретения, необходимо принять во внимание, что это изобретение не ограничено конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут

варьироваться. Следует также понимать, что употребляемая в данном документе терминология применяется только с целью описания конкретных вариантов осуществления и не имеет ограничительного характера, поскольку объем настоящего изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Любые варианты осуществления или признаки вариантов осуществления могут комбинироваться друг с другом, и такие комбинации в явном виде охватываются объемом настоящего изобретения.

[0038] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом обычной квалификации в области, к которой принадлежит это изобретение. Используемый в настоящем документе термин «около» касательно конкретного цитируемого числового значения означает, что данное значение может отличаться от цитируемого значения не более чем на 1%. Например, используемое в данном документе выражение «около 100» включает в себя 99 и 101, и все значения между ними (*например*, 99,1; 99,2; 99,3; 99,4 и т. д.).

[0039] Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, можно использовать при практической реализации или испытании настоящего изобретения, далее описаны предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки и непатентные публикации, упоминаемые в этом описании, в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

#### **Сокращения, используемые в данном документе**

[0040] MS/MS: тандемная масс-спектрометрия

[0041] MS: масс-спектрометрия

[0042] ITR: последовательности инвертированных терминальных повторов

[0043] Вектор rAAV: рекомбинантный вектор AAV

[0044] HPLC: жидкостная хроматография гидрофильного взаимодействия

[0045] GAA: лизосомальная альфа-глюкозидаза

[0046] mAb: моноклональное антитело

[0047] IgG: иммуноглобулин G

[0048] LC: легкая цепь

[0049] HC: тяжелая цепь

[0050] AAV: аденоассоциированный вирус

[0051] PTM: посттрансляционные модификации

[0052] ERT: заместительная ферментная терапия

#### **[0053] Определения**

[0054] «Аденоассоциированный вирус» или «AAV»: AAV представляет собой непатогенный парвовирус с одноцепочечной ДНК и геномом размером примерно 4,7 т.п.н., без оболочки и имеющий конформацию икосаэдра. Впервые AAV был обнаружен в 1965 году как контаминант препаратов аденовируса. AAV принадлежит к роду *Dependovirus* и семейству Parvoviridae, требуя для репликации вспомогательных функций

либо вируса герпеса, либо аденовируса. В отсутствие вируса-помощника, AAV может переходить в латентную фазу, интегрируясь в хромосому 19 человека в локализации 19q13.4. Геном AAV состоит из двух открытых рамок считывания (ORF), по одной для каждого из двух генов AAV, Rep и Cap. Концы ДНК AAV имеют инвертированный терминальный повтор (ITR) длиной 145 п.о., а 125 терминальных оснований являются палиндромными, что обуславливает характерную T-образную шпильчатую структуру.

[0055] Ген Rep транскрибируется с промоторов p5 и p19 в четыре белка Rep (Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40), которые играют важную роль в жизненном цикле вируса. Белки Rep78 и Rep68 кодируются мРНК, транскрибируемой с промотора p5. Эти белки необходимы для репликации вирусной ДНК, транскрипции и контроля сайт-специфической интеграции. Белки Rep52 и Rep40 кодируются мРНК, транскрибируемой с промотора p19. Эти белки вовлечены в образование одноцепочечного вирусного генома для упаковки и вирусной интеграции. Ген Cap кодирует три вирусных капсидных белка: VP1 (735 аминокислот, ~ 90 кДа), VP2 (598 аминокислот, ~ 72 кДа) и VP3 (533 аминокислоты, ~ 60 кДа), которые образуют вирусный капсид из 60 субъединиц, в соотношении 1:1:10 (см. Фиг. 2А и 2В). Три капсидных белка транслируются с мРНК, транскрибируемой с промотора p40.

[0056] Термин «антитело», используемый в данном документе, предназначен для обозначения иммуноглобулиновых молекул, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями (*т. е.* «полными молекулами антител»), а также их мультимерами (*например*, IgM) или их антигенсвязывающими фрагментами. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (HCVR или V<sub>H</sub>) и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> и C<sub>H3</sub>). В различных вариантах осуществления тяжелая цепь может представлять собой изотип IgG. В некоторых случаях тяжелая цепь выбрана из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь является изотипом IgG1 или IgG4, необязательно включая в себя химерную шарнирную область изотипа IgG1/IgG2 или IgG4/IgG2. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (LCVR или V<sub>L</sub>) и константной области легкой цепи (C<sub>L</sub>). Области V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин «антитело» включает в себя обозначение как гликозилированных, так и на негликозилированных иммуноглобулинов любого изотипа или подкласса. Термин «антитело» включает в себя молекулы антител, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными способами, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. Обзор структуры антител см. Lefranc et al., *IMGT unique numbering for immunoglobulin and*

*T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains*, 27(1) Dev. Comp. Immunol. 55-77 (2003); и M. Potter, *Structural correlates of immunoglobulin diversity*, 2(1) Surv. Immunol. Res. 27-42 (1983).

[0057] Термин антитело также охватывает «биспецифическое антитело», включающее в себя гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться с несколькими различными эпитопами. Одна половина биспецифического антитела, включающая в себя одну тяжелую цепь, одну легкую цепь и шесть CDR, связывается с одним антигеном или эпитопом, а другая половина антитела связывается с другим антигеном или эпитопом. В некоторых случаях биспецифическое антитело может связывать один и тот же антиген, но разными эпитопами или не перекрывающимися эпитопами. В некоторых случаях обе половины биспецифического антитела имеют одинаковые легкие цепи, сохраняя при этом двойную специфичность. Биспецифические антитела, в целом, описаны в публ. заявки на пат. США № 2010/0331527(30 декабря 2010 г.).

[0058] Термин «антигенсвязывающая часть» или «антигенсвязывающий фрагмент» антитела относится к одному или более фрагментов антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающая часть» антитела, включают в себя (i) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, бивалентный фрагмент, состоящий из двух фрагментов Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward et al., Nature 241:544-546 (1989)), который состоит из домена VH; (vi) выделенную CDR и (vii) scFv, который состоит из двух доменов фрагмента Fv, VL и VH, соединенных синтетическим линкером с образованием единой белковой цепи, в которой области VL и VH создают пару с образованием моновалентных молекул. Другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела, также охватываются термином «антитело» (см., например, Holliger et al. (1993) 90 PNAS U.S.A. 6444-6448; и Poljak et al. (1994) 2 Structure 1121-1123).

[0059] Более того, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с использованием стандартных методов рекомбинантной ДНК, широко известных в данной области (см. Sambrook et al., 1989).

[0060] Термин «антитело человека» предназначено для включения в себя антител, которые имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Человеческие mAb по данному изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, вводимые случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например в CDR и, в частности, в CDR3. Однако термин «антитело человека», используемый в данном документе, не предназначен для включения



в себя mAb, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих (например мыши), были привиты на последовательности FR человека. Этот термин включает в себя антитела, рекомбинантно полученные в организме не относящегося к человеку млекопитающего или в клетках не относящегося к человеку млекопитающего. Данный термин не включает в себя антитела, выделенные у человека-субъекта или полученные от него.

[0061] Термин «соответствующий» является относительным термином, обозначающим сходство по положению, цели или структуре. Масс-спектральный сигнал, обусловленный конкретным пептидом или белком, также называется сигналом, соответствующим пептиду или белку. В некоторых вариантах осуществления конкретная пептидная последовательность или набор аминокислот, такой как белок, может быть отнесен к соответствующей пептидной массе.

[0062] Термин «выделенный», используемый в настоящем документе, относится к биологическому компоненту (такому как нуклеиновая кислота, пептид, белок, липид, вирусная частица или метаболит), который был по существу отделен, получен отдельно или очищен от других биологических компонентов в клетке организма, в которой компонент естественным образом встречается или трансгенетически экспрессируется.

[0063] «Масс-спектрометрия» - это метод, в котором образец анализируется путем генерации из образца в газовой фазе ионов, которые затем разделяются в соответствии с их соотношением массы к заряду ( $m/z$ ) и детектируются. Способы генерации из образца ионов в газовой фазе включают ионизацию электрораспылением (electrospray ionization - ESI), матрично-активированную лазерную десорбцию-ионизацию (matrix-assisted laser desorption-ionization - MALDI), усиленную поверхностью лазерную десорбцию-ионизацию (surface-enhanced laser desorption-ionization - SELDI), химическую ионизацию и ионизацию электронным ударом (electron-impact ionization - EI). Разделение ионов по соотношению  $m/z$  может быть осуществлено с помощью любого типа масс-анализаторов, включая квадрупольные масс-анализаторы (Q), время-пролетные масс-анализаторы (time-of-flight - TOF), магнитные секторные масс-анализаторы, 3D и линейные ионные ловушки (ion traps - IT), масс-анализаторы с орбитальной ловушкой, анализаторы с циклотронным ионным резонансом и Фурье-преобразованием (Fourier-transform ion cyclotron resonance - FT-ICR) и их комбинации (например, квадрупольный время-пролетный анализатор или анализатор Q-TOF (quadrupole-time-of-flight - Q-TOF)). Перед разделением образец может быть подвергнут одному или более измерений хроматографического разделения, например, HPLC.

[0064] ТанDEMная масс-спектрометрия или MS/MS - это метод разрушения выбранных ионов (ионов-предшественников) на фрагменты (ионы-продукты). Затем по фрагментам выявляют аспекты химической структуры иона-предшественника. В танDEMной масс-спектрометрии после ионизации образцов (например, путем ESI, MALDI, EI и т. д.) для получения смеси ионов, ионы-предшественники, например пептиды из гидролизата, с определенным соотношением массы к заряду ( $m/z$ ) выбирают (MS1), а

затем фрагментируют (MS2) для получения ионов-продуктов для обнаружения. Типичные тандемные МС-приборы включают в себя QqQ, QTOF и гибридные ионные ловушки/FTMS и т. д. Одним примером применения тандемной масс-спектрометрии является идентификация белков. Первый масс-анализатор выделяет ионы с определенным значением  $m/z$  среди множества, введенного в источник ионов, а затем выходящего из него, которые представляют собой один вид пептида. Эти ионы затем ускоряются до входа в ячейку столкновения, содержащую инертный газ, такой как аргон, чтобы произвести фрагментацию ионов. Этот процесс называется индуцированной столкновениями диссоциацией (CID) или активированной соударениями диссоциацией (CAD). Значения  $m/z$  ионов фрагментов затем измеряются во 2<sup>м</sup> масс-анализаторе для получения информации о аминокислотной последовательности. Тандемная масс-спектрометрия может использоваться для идентификации последовательности пептидов и, следовательно, белков с полной или частичной длиной в соответствии со способами, раскрытыми в настоящем документе. Ионы-предшественники могут активироваться (с повышением внутренней энергией) различными способами. Профили фрагментации зависят от того, как энергия передается иону-предшественнику, от количества переданной энергии и от того, как передаваемая энергия распределяется внутри. Индуцированная столкновениями диссоциация и инфракрасная мультифотонная диссоциация являются методами «медленного нагрева», которые увеличивают температуру Больцмана иона и, таким образом, преимущественно разрушают самые слабые связи.

[0065] Термины «пептид», «белок» и «полипептид» относятся, взаимозаменяемо, к полимерам аминокислот и/или аналогам аминокислот, которые соединяются пептидными связями или имитациями пептидных связей. Двадцать встречающихся в природе аминокислот и их однобуквенные и трехбуквенные обозначения выглядят следующим образом: Аланин A Ala; Цистеин C Cys; Аспарагиновая кислота D Asp; Глутаминовая кислота E Glu; Фенилаланин F Phe; Глицин Gly; Гистидин H His; Изолейцин I Ile; Лизин K Lys; Лейцин L Leu; Метионин M Met; Аспарагин N Asn; Пролин P Pro; Глутамин Q Gin; Аргинин R Arg; Серин S Ser; Треонин T Thr; Валин V Val; Триптофан W Trp и Тирозин Y Tyr.

[0066] Указания на массу аминокислоты означают моноизотопную массу или среднюю массу аминокислоты при заданной изотопной распространенности, такой как естественная распространенность. В некоторых примерах масса аминокислоты может быть специально изменена, например путем маркирования аминокислоты изотопом. Для отдельных одиночных аминокислот, исходя из точного изотопного состава аминокислот, ожидается некоторая степень изменчивости вблизи средней массы аминокислоты. Массы, в том числе моноизотопные и средние массы для аминокислот, может легко определять любой специалист обычной квалификации в данной области техники.

[0067] Аналогичным образом, указания на массу пептида или белка означают моноизотопную массу или среднюю массу пептида или белка при заданной изотопной распространенности, такой как естественная распространенность. В некоторых примерах

масса пептида может быть специально изменена, например путем мечения изотопом одной или более аминокислот в пептиде или белке. Для отдельных одиночных пептидов, исходя из точного изотопного состава пептида, ожидается некоторая степень изменчивости вблизи средней массы пептида. Масса конкретного пептида может быть определена специалистом в данной области техники.

[0068] Термин «вектор», используемый в данном документе, относится к рекомбинантной плазмиде или вирусу, который содержит нуклеиновую кислоту, которая должна быть доставлена в клетку-хозяин, либо *in vitro* либо *in vivo*.

[0069] Термин «полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота», используемый в данном документе, относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, как рибонуклеотидов, так и дезоксирибонуклеотидов. Таким образом, этот термин включает в себя, помимо прочего, одно-, двух- или многоцепочечную ДНК или РНК, геномную ДНК, кДНК, гибриды ДНК-РНК или полимер, содержащий пуриновые и пиримидиновые основания или другие природные, химически или биохимически модифицированные, неприродные или дериватизированные нуклеотидные основания. Каркас нуклеиновой кислоты может содержать сахара и фосфатные группы (которые обычно могут быть найдены в РНК или ДНК) или модифицированные или замещенные сахарные или фосфатные группы.

[0070] В альтернативном варианте, каркас нуклеиновой кислоты может включать полимер синтетических субъединиц, таких как фосфорамидаты, и, таким образом, может представлять собой фосфорамидат олигодезоксинуклеозида (P-NH<sub>2</sub>) или смешанный олигомер фосфорамидат-фосфодиэфира. Кроме того, двухцепочечная нуклеиновая кислота может быть получена из одноцепочечного полинуклеотидного продукта химического синтеза либо путем синтеза комплементарной цепи и отжига цепей в соответствующих условиях, либо путем синтеза комплементарной цепи *de novo* с использованием ДНК-полимеразы с подходящим праймером.

[0071] «Рекомбинантный вирусный вектор» относится к рекомбинантному полинуклеотидному вектору, включающему одну или более гетерологичных последовательностей (т.е. последовательность нуклеиновой кислоты невирусного происхождения).

[0072] «Рекомбинантный вектор AAV (вектор rAAV)» относится к полинуклеотидному вектору, включающему одну или более гетерологичных последовательностей (т.е. последовательность нуклеиновой кислоты, не имеющую происхождения AAV), которая может быть фланкирована по меньшей мере одной, например, двумя, последовательностями инвертированных терминальных повторов AAV (ITR). Такие векторы rAAV могут быть реплицированы и упакованы в инфекционные вирусные частицы, если они присутствуют в клетке-хозяине, которая была инфицирована подходящим вспомогательным вирусом (или которая экспрессирует подходящие вспомогательные функции) и которая экспрессирует продукты генов *rep* и *cap* AAV (т.е. белки Rep и Cap AAV).

[0073] «Вирусная частица» относится к вирусной частице, состоящей по меньшей мере из одного вирусного капсидного белка и инкапсулированного вирусного генома.

[0074] «Гетерологичный» означает полученный из генотипически отличного элемента от остальной части элемента, с которым он сравнивается или в который он введен или инкорпорирован. Например, нуклеиновая кислота, введенная методами генной инженерии в другой тип клеток, представляет собой гетерологичную нуклеиновую кислоту (и при экспрессии может кодировать гетерологичный полипептид). Точно так же клеточная последовательность (например, ген или его часть), которая включена в вирусный вектор, представляет собой гетерологичную нуклеотидную последовательность по отношению к вектору.

[0075] Последовательность «инвертированного конечного повтора» или «ITR» представляет собой относительно короткие последовательности, обнаруживаемые на концах вирусных геномов, которые находятся в противоположной ориентации. Последовательность «инвертированного терминального повтора AAV (ITR)» представляет собой приблизительно 145-нуклеотидную последовательность, которая присутствует на обоих концах одноцепочечного генома AAV.

[0076] Термин «хроматография гидрофильного взаимодействия» или HILIC предназначен для описания процесса, использующего гидрофильную неподвижную фазу и гидрофобную органическую подвижную фазу, в которой гидрофильные соединения удерживаются дольше, чем гидрофобные соединения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в указанном способе используется подвижная фаза смешивающегося с водой растворителя.

[0077] Термин «образец», используемый в настоящем документе, относится к смеси молекул, которая содержит по меньшей мере вирусную частицу, такую как частица AAV, которая подвергается манипуляции в соответствии со способами настоящего изобретения, включая, например, разделение, анализ, извлечение, концентрирование, профилирование и тому подобное.

[0078] Термин «хроматографическая поверхность», используемый в настоящем документе, включает поверхность, на которую воздействуют образец или аналиты. Хроматографическая поверхность может быть химически модифицирована, функционализована или активирована или иметь микроструктуру, например, поры. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения хроматографическая поверхность может быть гидрофобной, гидрофильной (полярной) или ионной. В других вариантах осуществления настоящего изобретения хроматографическая поверхность является полностью пористой, поверхностно пористой или непористой.

[0079] Термин «хроматографическое ядро», используемый в настоящем документе, включает, помимо прочего, органический материал, такой как диоксид кремния, в форме частицы, монолита или другой подходящей структуры, которая образует внутреннюю часть материалов по настоящему изобретению. В определенных аспектах поверхность хроматографического ядра представляет собой хроматографическую поверхность или

представляет собой материал, заключенный в хроматографическую поверхность, как определено в данном документе. Материал хроматографической поверхности может быть размещен на хроматографическом ядре, прикреплен к нему или отождествлен таким образом, чтобы можно было различить дискретный или отчетливый переход, или может быть связан с хроматографическим ядром таким образом, чтобы смешиваться с поверхностью хроматографического ядра, что приводит к градации материалов и отсутствию дискретной внутренней поверхности ядра. В некоторых аспектах материал хроматографической поверхности может быть таким же или отличаться от материала хроматографического ядра и может проявлять физические или физико-химические свойства, отличающиеся от хроматографического ядра, включая, помимо прочего, объем пор, площадь поверхности, средний диаметр пор, содержание углерода или гидролитическая стабильность pH.

[0080] Термин «гидрофильный», используемый в настоящем документе, описывает наличие аффинности, притяжение, адсорбцию или поглощение воды.

[0081] Термин «гидрофильный», используемый в настоящем документе, описывает отсутствие аффинности, отталкивание или неспособность адсорбировать или поглощать воду.

[0082] Термин «хроматография», используемый в настоящем документе, относится к процессу разделения смеси, например, смеси, содержащей вирусные капсидные белки. Она включает в себя прохождение смеси через стационарную фазу, которая разделяет молекулы, представляющие интерес, от других молекул в смеси и позволяет выделять одну или более молекул, представляющих интерес. Примером метода хроматографического разделения является жидкостная хроматография гидрофильного взаимодействия (HPLC).

[0083] Термин «приведение в контакт», используемый в настоящем документе, включает объединение по меньшей мере двух веществ в растворе или твердой фазе, например, приведение в контакт неподвижной фазы хроматографического материала с образцом, таким как образец, содержащий вирусные частицы.

#### [0084] **Общее описание**

[0085] Болезнь Помпе представляет собой аутосомно-рецессивное лизосомальное нарушение накопления, вызванное мутациями в гене GAA, кодирующем кислотную  $\alpha$ -глюкозидазу (GAA) - лизосомальный фермент, ответственный за гидролиз гликогена до глюкозы. Дефицит GAA приводит к накоплению гликогена в лизосомах и последующей клеточной дисфункции в сердечных, скелетных и гладких мышцах, а также в центральной нервной системе. Болезнь Помпе может проявляться в раннем возрасте как болезнь Помпе с манифестацией в младенческом возрасте (infantile onset Pompe disease - IOPD) или позже в детстве и в зрелом возрасте, как болезнь Помпе с поздней манифестацией (late onset Pompe disease - LOPD). Дыхательная недостаточность является частой причиной смерти при обоих типах болезни Помпе.

[0086] В настоящее время единственным лечением болезни Помпе, одобренным Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов,

является заместительная ферментная терапия (enzyme replacement therapy - ERT). Однако системно вводимая GAA не проникает через гематоэнцефалический барьер и, следовательно, не может быть эффективной для лечения патологии ЦНС и пораженных дыхательных двигательных нейронов. Кроме того, ERT лишь частично корректирует патологии скелетных мышц из-за низкого поглощения мышечными волокнами. Следовательно, две трети пациентов с IOPD в конечном итоге нуждаются в дыхательной поддержке аппаратом ИВЛ, а у пациентов с LOPD сохраняется респираторная недостаточность.

[0087] Генная терапия с применением векторов аденоассоциированного вируса (AAV) идеально подходит для лечения болезни Помпе, поскольку это моногенетическое заболевание. Одна из изучаемых стратегий - комбинация замены фермента со связанными антителами. В одном примере изучается применение высокого уровня экспрессии анти-CD63::GAA из печени посредством генной терапии для преодоления иммунного ответа на замещающий фермент, наблюдаемого у пациентов без эндогенного фермента (см. Фиг. 1). Как и в случае со всеми вирусными векторными системами, важно убедиться, что терапевтическая композиция содержит надлежащее количество правильно сформированных вирусных частиц. Таким образом, очень важным является определение стехиометрии и белкового состава вирусных частиц.

[0088] Аспекты этого изобретения относятся к способу определения стехиометрии белковых компонентов вирусного капсида вирусной частицы. В вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ включает подвергание образца вирусных частиц жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия (HILIC) для разделения белковых компонентов вирусного капсида вирусных частиц, таких как представляющие интерес вирусные частицы, когда информация о капсиде является желательной. В вариантах осуществления настоящего изобретения колонка HILIC контактирует с образцом, содержащим вирусные частицы. В некоторых осуществлениях настоящего изобретения указанный способ включает определение масс белковых компонентов вирусного капсида для идентификации белковых компонентов, разделенных с помощью HILIC, например, с применением методов масс-спектрометрии, таких как описанные в данном документе. В вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ включает вычисление относительного содержания белковых компонентов вирусного капсида из HILIC-разделения для определения стехиометрии белковых компонентов вирусного капсида вирусной частицы, например, с помощью ультрафиолетового (УФ) обнаружения белковых компонентов вирусного капсида при их элюировании из колонки HILIC. Например, площадь УФ-пика может использоваться для определения относительного содержания капсидных белков и может использоваться для расчета стехиометрии капсидных белков в жизнеспособном капсиде (см. Фиг. 4). В другом примере, для определения относительного содержания используются высота пика и/или УФ интенсивность пика. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения время удерживания различных белков на колонке HILIC определяется как

функция используемой подвижной фазы, и в последующем анализе это время удерживания можно использовать для определения белков и относительного содержания белков в вирусной частице без необходимости определять массу и/или идентичность белков каждый раз при определении стехиометрии, например, может быть разработано стандартное значение или значения. До разработки этого изобретения было очень трудно разделить различные капсидные белки с помощью обычных методов хроматографии (см. Фиг. 3А и 3В). Используя условия образца, обсуждаемые в данном документе для НПЛС, было достигнуто хорошее разделение вирусных частиц ААV. Кроме того, применение колонки НПЛС устраняет необходимость в стадии денатурации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ применяют для определения серотипа вирусной частицы. Например, массы VP 1, VP2 и VP3 каждого серотипа ААV являются уникальными и могут использоваться для идентификации или дифференциации серотипов капсида ААV. Кроме того, отделенные капсидные белки могут быть подвергнуты последующему анализу, такому как определение последовательности белка и посттрансляционных модификаций капсидных белков, например, с точным измерением массы на уровне интактного белка.

[0089] Аспекты этого изобретения относятся к способу определения гетерогенности белковых компонентов капсида вирусной частицы. В вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ включает подвергание вирусной частицы НПЛС для разделения белковых компонентов капсида вирусной частицы. В вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ включает определение масс белковых компонентов белкового капсида. В некоторых случаях массы белковых компонентов капсида вирусных частиц сравнивают с теоретическими массами капсида вирусных частиц. Отклонение одной или более масс белковых компонентов капсида вирусных частиц указывает на то, что один или более белков капсида являются гетерогенными (см. Фиг. 5А). И наоборот, отсутствие отклонений указывает на то, что белки капсида являются гомогенными (см. Фиг. 5В-5D). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерогенность обусловлена одним или более смешанных серотипов, вариантных капсидов, аминокислотных замен капсидов, усеченных капсидов или модифицированных капсидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения определение стехиометрии белковых компонентов вирусного капсида вирусной частицы и определение гетерогенности белковых компонентов в капсиде вирусной частицы выполняется на одном и том же образце, например, в одном тесте.

[0090] В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения вирусная частица представляет собой частицу аденоассоциированного вируса (AAV), и описанные способы можно применять для определения стехиометрии белковых компонентов в капсиде частицы ААV и/или для определения гетерогенности белковых компонентов в капсиде частицы ААV. В вариантах осуществления настоящего изобретения белковые компоненты белкового капсида содержат VP1, VP2 и VP3 частицы

AAV. В вариантах осуществления настоящего изобретения частица AAV представляет собой рекомбинантную частицу AAV (rAAV). В вариантах осуществления настоящего изобретения частица AAV включает вектор AAV, кодирующий гетерологичный трансген. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения определенную или рассчитанную массу согласно настоящему изобретению (например, определенную или рассчитанную массу VP1, VP2 и/или VP3 частицы AAV) можно сравнить с эталоном, например, теоретической массой VP1, VP2 и/или VP3 одного или более серотипов AAV (см., например, Фигуры 2А и 2В). Эталон может включать теоретическую массу VP1, VP2 и/или VP3 одного или более серотипов AAV. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения массы VP1, VP2 и VP3 сравнивают с теоретическими массами одного или более из следующих капсидов: капсида AAV1, капсида AAV2, капсида AAV3, капсида AAV4, капсида AAV5, капсида AAV6, капсида AAV7, капсида AAV8, капсида AAVrh8, капсида AAV9, капсида AAV10, капсида AAV11, капсида AAV 12 или их варианта. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения определенную или рассчитанную массу (например, определенную или рассчитанную массу VP1, VP2 и/или VP3 частицы AAV) можно сравнить с теоретической массой VP1, VP2 и/или VP3 соответствующего серотипа AAV.

[0091] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы по настоящему изобретению могут включать определение гетерогенности белков частицы AAV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения отклонение одной или более масс VP1, VP2 и/или VP3 (например, от эталонной массы, такой как теоретическая, прогнозируемая или ожидаемая масса) указывает на гетерогенность капсидного белка AAV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерогенность может включать, помимо прочего, один или более из следующих элементов: смешанные серотипы, вариантные капсиды, замены аминокислот капсида, усеченные капсиды или модифицированные капсиды.

[0092] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способ определения гетерогенности частицы AAV может включать в себя подвергание денатурированной частицы AAV ЖХ/МС (например, как описано в данном документе), определение масс VP1, VP2 и VP3 частицы AAV и их сравнение этих масс с теоретическими массами VP1, VP2 и VP3 серотипа AAV; а также подвергание фрагментов VP1, VP2 и/или VP3 ЖХ-МС/МС, определение масс фрагментов VP1, VP2 и VP3 частицы AAV и сравнение этих массы с теоретическими массами VP1, VP2 и VP3 серотипа AAV (отклонение одной или более масс VP1, VP2 или VP3 указывает на гетерогенность капсида AAV).

[0093] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения частица AAV включает капсид AAV1, капсид AAV2, капсид AAV3, капсид AAV4, капсид AAV5, капсид AAV6, капсид AAV7, капсид AAV8, капсид AAVrh8, капсид AAV9, капсид AAV10, капсид AAV11, капсид AAV 12 или их вариант.

[0094] В вариантах осуществления настоящего изобретения массы VP1, VP2 и VP3



сравнивают с теоретическими массами одного или более из следующих капсидов: капсида AAV1, капсида AAV2, капсида AAV3, капсида AAV4, капсида AAV5, капсида AAV6, капсида AAV7, капсида AAV8, капсида AAVrh8, капсида AAV9, капсида AAV10, капсида AAV11, капсида AAV 12 или их варианта.

[0095] В вариантах осуществления настоящего изобретения частица AAV содержит AAV1 ITR, AAV2 ITR, AAV3 ITR, AAV4 ITR, AAV5 ITR, AAV6 ITR, AAV7 ITR, AAV8 ITR, AAVrh8 ITR, AAV9 ITR, AAV 10 ITR, AAV11 ITR или AAV 12 ITR.

[0096] В вариантах осуществления настоящего изобретения частица AAV имеет серотип капсида, выбранный для трансдукции клеток печени субъекта. В вариантах осуществления настоящего изобретения частица AAV имеет капсидный серотип AAV7, AAV8 или AAV9, которые являются селективными для трансдукции клеток печени субъекта.

[0097] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения частица AAV представляет собой рекомбинантную частицу AAV (rAAV). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения частица AAV содержит вектор AAV, кодирующий гетерологичный трансген. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения частица AAV имеет капсидный серотип AAV7, AAV8 или AAV9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения частица AAV имеет капсидный серотип AAV9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения частица AAV имеет капсидный серотип AAV9 и представляет собой вирусный вектор, кодирующий лизосомальную альфа-глюкозидазу (GAA), связанную с антителом, специфичным для антигена, экспрессируемого мышечной клеткой (например, антитело анти-CD63).

[0098] Хотя AAV был модельной вирусной частицей для этого изобретения, предполагается, что описанные способы могут быть применены для профилирования множества вирусов, например, вирусных семейств, подсемейств и родов. Способы настоящего изобретения могут найти применение, например, в профилировании VP для мониторинга экспрессии VP, посттрансляционных модификаций и усечений, а также для обеспечения согласованности продукта во время продукции VLP, для подтверждения сайт-направленного мутагенеза или структурной характеристики для инженерных применений капсидных белков, и/или для мониторинга или обнаружения гетерогенности вирусной частицы или препарата.

[0099] В вариантах осуществления настоящего изобретения вирусная частица кодирует гетерологичный трансген.

[00100] В вариантах осуществления настоящего изобретения вирусная частица принадлежит к семейству вирусов, выбранных из группы, состоящей из Adenoviridae, Parvoviridae, Retroviridae, Baculoviridae и Herpesviridae.

[00101] В вариантах осуществления настоящего изобретения вирусная частица принадлежит к роду вирусов, выбранному из группы, состоящей из атаденовируса, авиаденовируса, ихтаденовируса, мастаденовируса, сиаденовируса, амбиденсовируса,

бревиденсовируса, гепанденсовируса, итераденсовируса, пенстилденсовируса, амдопарвовируса, авепарвовируса, бокапарвовируса, копипарвовируса, депендопарвовируса, эритропарвовируса, протопарвовируса, тетрапарвовируса, альфаретровируса, бетаретровируса, дельтаретровируса, эpsilonретровируса, гаммаретровируса, лентивируса, спумавируса, альфабакуловируса, бетабакуловируса, дельтабакуловируса, гаммабакуловируса, илтовируса, мардивируса, симплексвируса, варицелловируса, цитомегаловируса, муромегаловируса, пробосцивируса, розеоловируса, лимфокриптовируса, макавируса, перкавируса и радиновируса.

[00102] В вариантах осуществления настоящего изобретения Retroviridae представляет собой вирус саркомы мышей Молони (MoMSV), вирус саркомы мышей Харви (HaMuSV), вирус опухоли молочной железы мышей (MuMTV), вирус лейкоза обезьян гиббонов (GaLV), вирус лейкоза кошек (FLV), спумавирус, вирус Фрэндретровирус, вирус стволовых клеток мыши (MSCV), вирус саркомы Рауса (RSV), вирусы Т-клеточного лейкоза человека, вирус иммунодефицита человека (HIV), вирус иммунодефицита кошек (FIV), вирус иммунодефицита лошадей (EIV), вирус висна-маэди; вирус артрита-энцефалита коз; вирус инфекционной анемии лошадей; вирус иммунодефицита кошек (FIV); вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV); или вирус иммунодефицита обезьян (SIV).

[00103] Хроматография гидрофильного взаимодействия (HILIC) представляет собой вариант НФ-ВЭЖХ, которую можно проводить с частично водными подвижными фазами, что позволяет разделять пептиды, углеводы, нуклеиновые кислоты и многие белки по нормальным фазам. Порядок элюирования HILIC от наименее полярного до наиболее полярного, противоположный таковому в обращенно-фазовой ВЭЖХ.

[00104] HILIC разделяет аналиты на основе полярных взаимодействий между аналитами и неподвижной фазой (например, субстратом). Полярный аналит связывается и удерживается полярной неподвижной фазой. Адсорбционная сила увеличивается с увеличением полярности аналита, а взаимодействие между полярным аналитом и полярной неподвижной фазой (относительно подвижной фазы) увеличивает время элюирования. Применение более полярных растворителей в подвижной фазе сокращает время удерживания аналитов, в то время как более гидрофобные растворители имеют тенденцию к увеличению времени удерживания.

[00105] С HILIC можно применять различные типы субстратов, например, для колоночной хроматографии, включая субстраты из диоксида кремния, аминокислоты, амида, целлюлозы, циклодекстрина и полистирола. Примеры пригодных субстратов, например, которые можно применять для колоночной хроматографии, включают: полисульфоэтил-аспартамид (например, от PolyLC), субстрат сульфобетаина, например, ZIC®-HILIC (например, от SeQuant), POROS® HS (например, от Applied Biosystems), POROS® S (например, от Applied Biosystems), Полигидроэтил-аспартамид (например, от PolyLC), Zorbax 300 SCX (например, от Agilent), PolyGLYCOPLEX® (например, от PolyLC), Amide-80 (например, от Tosohaas), TSK GEL® Amide-80 (например, от Tosohaas),

Полигидроксиэтил А (например, от PolyLC), Glyco-Sep-N (например, от Oxford GlycoSciences) и Atlantis HILIC (например, от Waters). Колонки, которые можно применять в описанных способах, включают колонки, которые используют одну или более из следующих функциональных групп: карбамоильные группы, сульфопропильные группы, сульфозетильные группы (например, поли(2-сульфозетил аспартамид)), гидроксизетильные группы (например, поли(2-гидроксизетиласпартамид)) и группы ароматической сульфоновой кислоты.

[00106] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения капсидные белки разделяют на колонке HILIC и впоследствии элюируют из колонки HILIC, например, с применением градиента подвижной фазы для разделения отдельных капсидных белков, тем самым очищая и/или разделяя капсидные белки в образце. В определенных примерах элюированные капсидные белки из колонки HILIC разделяют на одну или более фракций. Такие фракции можно применять для последующего анализа, такого как масс-спектрометрический анализ. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанные способы включают идентификацию капсидных белков, присутствующих в одной или более фракций.

[00107] Применяемая подвижная фаза может включать буферы с агентами для образования пары ионов и без них, например, ацетонитрил и воду. Агенты для образования пары ионов включают формиат, ацетат, TFA и соли. Можно применять градиенты буферов, например, если применяются два буфера, концентрация или процентное содержание первого буфера может уменьшаться, в то время как концентрация или процентное содержание второго буфера увеличивается в ходе хроматографирования. Например, процентное содержание первого буфера может уменьшаться от около 100%, около 99%, около 95%, около 90%, около 85%, около 80%, около 75%, около 70%, около 65%, около 60%, около 50%, около 45% или от около 40% до около 0%, около 1%, около 5%, около 10%, около 15%, около 20%, около 25%, около 30%, около 35% или около 40% в ходе хроматографирования. В другом примере процентное содержание второго буфера может повышаться от около 0%, около 1%, около 5%, около 10%, около 15%, около 20%, около 25%, около 30%, около 35%, около 40% до около 100%, около 99%, около 95%, около 90%, около 85%, около 80%, около 75%, около 70%, около 65%, около 60%, около 50%, около 45% или около 40% в ходе того же процесса хроматографирования. В вариантах осуществления настоящего изобретения доля подвижной фазы А в хроматографии со временем увеличивается. Необязательно, концентрация или процентное содержание первого и второго буфера может вернуться к своим начальным значениям в конце хроматографирования. Например, процентное содержание первого буфера может изменяться за пять этапов от 85% до 63% до 59% и от 10% до 85%; в то время как процентное содержание второго буфера за то же количество этапов изменяется от 15% до 37% до 41% до 90% до 15%. Проценты могут изменяться постепенно как линейный градиент или нелинейным (например, ступенчатым) образом. Например, градиент может быть многофазным, например, двухфазным, трехфазным и т. д. В предпочтительных

вариантах осуществления настоящего изобретения, в описанных в данном документе способах применяется убывающий градиент ацетонитрильного буфера, который соответствует возрастающей полярности подвижной фазы без применения агентов для образования пары ионов. В вариантах осуществления настоящего изобретения HPLC использует подвижную фазу А, содержащую трифторуксусную кислоту в воде. В вариантах осуществления настоящего изобретения подвижная фаза А содержит около 0,1% трифторуксусной кислоты. В вариантах осуществления настоящего изобретения хроматография включает подвижную фазу В, содержащую трифторуксусную кислоту в ацетонитриле. В вариантах осуществления настоящего изобретения подвижная фаза В содержит около 0,1% трифторуксусной кислоты.

[00108] Температура колонки может поддерживаться постоянной на протяжении всего цикла хроматографии, например, с помощью промышленного нагревателя колонки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в колонке поддерживается температура от около 50°C до около 70 °C, *например*, от около 50°C до около 60 °C, от около 55°C до около 60 °C, *например*, около 50 °C, около 55 °C, около 60 °C, около 65°C или около 70 °C. В одном варианте осуществления настоящего изобретения температура составляет около 60 °C.

[00109] Скорость потока подвижной фазы может составлять от около 0 до около 100 мл/мин. Для аналитических целей, скорости потока обычно находятся в диапазоне от 0 до 10 мл/мин, для препаративной ВЭЖХ можно применять скорости потока, превышающие 100 мл/мин. Например, скорость потока может составлять около 0,5, около 1, около 1,5, около 2, около 2,5, около 3, около 3,5, около 4, около 4,5 или около 5 мл/мин. Замена колонки с таким же сорбентом, той же длины, но меньшего диаметра требует уменьшения скорости потока, чтобы поддерживать такое же время удерживания и разрешение для пиков, как на колонке большего диаметра. Предпочтительно применять скорость потока, эквивалентную около 1 мл/мин в колонке 4,6 × 100 мм, 5 мкм.

[00110] Время хроматографирования может составлять от около 15 до около 240 минут, например, от около 20 до около 70 минут, от около 30 до около 60 минут, от около 40 до около 90 минут, от около 50 минут до около 100 минут, от около 60 до около 120 минут, от около 50 до около 80 мин. В вариантах осуществления настоящего изобретения подвижная фаза А увеличивается от около 15% до около 100% в течение около 45 минут.

[00111] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанные способы включают подвергание вирусной частицы жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (ЖХ/МС). Как известно в данной области техники, ЖХ/МС использует жидкостную хроматографию для физического разделения ионов и масс-спектрометрию для получения масс-спектральных данных от ионов. Такие масс-спектральные данные могут использоваться для определения, например, молекулярной массы или структуры, идентификации частиц по массе, количеству, чистоте и так далее. Эти данные могут представлять свойства обнаруженных ионов, такие как сила сигнала (например, распространенность) в динамике (например, время удерживания) или относительное

содержание по отношению массы к заряду.

[00112] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения масс-спектрометрия (например, используемая в ЖХ/МС, как описано в данном документе) может относиться к масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (electrospray ionization mass spectrometry - ESI-MS). ESI-MS известна в данной области техники как метод, использующий электрическую энергию для анализа ионов, полученных из раствора, с помощью масс-спектрометрии (см., например, Yamashita, M. and Fenn, J.B. (1984). *Phys. Chem.* 88:4451-4459). Ионные частицы (или нейтральные частицы, которые ионизируются в растворе или в газовой фазе) переносятся из раствора в газовую фазу путем диспергирования в аэрозоле заряженных капель с последующим испарением растворителя, что уменьшает размер заряженных капель, и выбросом ионов образца из заряженных капель, когда раствор проходит через небольшой капилляр с напряжением относительно земли (например, стенка окружающей камеры ESI выполняется путем смешивания образца с летучей кислотой и органическим растворителем и его инфузии через проводящую иглу, заряженную высоким напряжением. Заряженные капли, которые разбрызгиваются (или выбрасываются) с конца иглы, направляются в масс-спектрометр и высушиваются под действием тепла и вакуума по мере того, как влетают. После высыхания капель оставшиеся заряженные молекулы направляются с помощью электромагнитных линз в масс-детектор и анализируются по массе. В одном варианте осуществления настоящего изобретения элюированный образец осаждается непосредственно из капилляра в форсунку для электрораспыления, например, капилляр выполняет функцию загрузчика образца. В другом варианте осуществления настоящего изобретения капилляр сам действует как устройство для экстракции и как форсунка для электрораспыления.

[00113] В случае MALDI, молекулы аналита (например, белки) осаждаются на металлических мишенях и совместно кристаллизуются с органической матрицей. Образцы сушат и вставляют в масс-спектрометр и обычно анализируют с помощью детектирования по времени пролета (time-of-flight - TOF). В одном варианте осуществления настоящего изобретения элюированный образец осаждается непосредственно из капилляра на металлическую мишень, например, сам капилляр выполняет функцию загрузчика образца. В одном варианте осуществления настоящего изобретения экстрагированный аналит осаждается на мишени MALDI, добавляется ионизационная матрица MALDI, и образец ионизируется и анализируется, например, с помощью TOF-детектирования.

[00114] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения применяются другие режимы ионизации, например ESI-MS, масс-спектрометрия с турбонаддувом, масс-спектрометрия с ионизацией нанораспылением, масс-спектрометрия с ионизацией термораспылением, масс-спектрометрия с ионизацией звуковым распылением, SELDI-MS и MALDI-MS. В целом преимущество этих методов состоит в том, что они позволяют проводить очистку образца «точно в срок» и непосредственно вводить его в ионизирующую среду. Важно отметить, что различные режимы ионизации и

обнаружения вводят свои собственные ограничения на природу применяемого десорбционного раствора, и важно, чтобы десорбционный раствор был совместим как с режимом ионизации, так и режимом обнаружения. Например, матрица образца во многих областях применения должна иметь низкую ионную силу или находиться в определенном диапазоне pH и т.д. В ESI, соль в образце может препятствовать обнаружению за счет снижения ионизации или засорения форсунки. Эта проблема решается за счет представления аналита с низким содержанием соли и/или за счет применения летучей соли. В случае MALDI, аналит должен находиться в растворителе, совместимом с наносимой пробой на мишени и с используемой ионизационной матрицей.

[00115] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанные способы включают подвергание вирусной частицы по настоящему изобретению или подвергание расщепленных фрагментов денатурированной вирусной частицы по настоящему изобретению жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии-масс-спектрометрии (ЖХ/МС/МС). Как известно в данной области техники, ЖХ/МС/МС (термин «жидкостная хроматография-тандемная масс-спектрометрия» может применяться в данном документе взаимозаменяемо) использует жидкостную хроматографию для физического разделения ионов и масс-спектрометрию для получения масс-спектральных данных по ионам, при этом масс-спектрометрия использует несколько множество этапов разделения изотопов (например,  $m/z$ ), обычно разделенных этапом фрагментации. Например, ионы, представляющие интерес, в диапазоне  $m/z$  могут быть разделены в первом цикле МС, фрагментированы, а затем дополнительно разделены на основе индивидуального  $m/z$  во втором цикле МС. Фрагментация ионов может включать, помимо прочего, такие методы, как диссоциация, индуцированная столкновениями (collision-induced dissociation - CID), диссоциация, индуцируемая высокоэнергетическими столкновениями (higher energy collision dissociation - HCD), диссоциация с захватом электрона (electron-capture dissociation - ECD) или диссоциация с переносом электрона (electron-transfer dissociation - ETD).

[00116] В данной области известны различные масс-анализаторы, пригодные для ЖХ/МС и/или ЖХ/МС/МС, включая, помимо прочего, времяпролетные (TOF) анализаторы, квадрупольные масс-фильтр, квадрупольные TOF (QTOF) и ионные ловушки (например, масс-спектрометр на основе преобразования Фурье или Orbitrap). В Orbitrap, бочкообразный внешний электрод с потенциалом земли и веретенообразный центральный электрод применяются для захвата ионов по траекториям, эллиптически вращающимся вокруг центрального электрода с колебаниями вдоль центральной оси, ограниченными балансом центробежных и электростатических сил. Использование таких инструментов включает операцию преобразования Фурье для конвертации сигнала временного интервала (например, частоты) из детектирования экранирующего тока в измерение массы с высоким разрешением (например, нано-ЖХ/МС/МС). Дополнительные описания и подробности можно найти, например, в публикациях Scheltens, R.A. et al. (2014) *Mol. Cell Proteomics* 13:3698-3708; Perry, R.H. et al. (2008) *Mass. Spectrom. Rev.*

27:661-699; и Scigelova, M. et al. (2011) *Mol. Cell Proteomics* 10:M11 1.009431.

[00117] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения могут быть определены массы белков вирусного капсида, например, на основании данных ЖХ/МС и/или ЖХ/МС/МС. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения массы VP1, VP2 и VP3 частицы AAV или фрагментов VP1, VP2 и VP3 частицы AAV могут быть определены, например, на основании данных ЖХ/МС и/или ЖХ/МС/МС. В данной области известны различные методы определения массы и/или идентичности белка по данным МС. Например, фингерпринтинг массы пептида можно применять для определения последовательности белка на основе данных МС, или белка можно идентифицировать на основе данных МС/МС, относящихся к одному или более составляющих пептидов. При тандемной МС, сканирование ионного продукта можно применять для анализа данных  $m/z$ , относящихся к одному или более пептидов белка, представляющего интерес. После этого можно применять программное обеспечение, известное в данной области техники, например, для сопоставления идентифицированных пиков с эталонными или известными пиками, для группирования пиков в оболочки изотопомеров и так далее. Значения массы пептидов можно сравнивать с базой данных известных пептидных последовательностей. Например, можно применять программное обеспечение Mascot для сопоставления наблюдаемых пептидов с теоретическими пептидами из базы данных, например, полученных в результате применения определенного профиля расщепления, с базой данных белков *in silico*. Другое пригодное программное обеспечение может включать, помимо прочего, Proteome Discoverer, ProteinProspector, X! Tandem, Pepfinder, Bonics или MassLynx™ (Waters).

[00118] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичная нуклеиновая кислота функционально связана с промотором. Типовые промоторы включают, помимо прочего, немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV), RSV LTR, MoMLV LTR, промотор фосфоглицераткиназы-1 (PGK), промотор обезьяньего вируса 40 (SV40) и промотор СК6, промотор транстиретина (TTR), промотор ТК, промотор, чувствительный к тетрациклину (TRE), промотор HBV, промотор hAAT, промотор LSP, химерные печеночно-специфические промоторы (LSP), промотор E2F, промотор теломеразы (hTERT); энхансер цитомегаловируса/бета-актин кур/промотор бета-глобина кролика (промотор CAG; Niwa et al., *Gene*, 1991, 108(2): 193-9) и промотор фактора элонгации 1-альфа (EF1 -альфа) (Kim et al., *Gene*, 1990, 91(2):217-23 и Guo et al., *Gene Ther.*, 1996, 3(9): 802-10). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения промотор включает промотор  $\beta$ -глюкуронидазы человека или энхансер цитомегаловируса, связанный с промотором  $\beta$ -актина кур (CBA). Промотор может быть конститутивным, индуцируемым или репрессиремым промотором. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается рекомбинантный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую гетерологичный трансген согласно настоящему описанию, функционально связанный с промотором CBA.

[00119] Примеры конститутивных промоторов включают, помимо прочего,

промотор LTR ретровирусного вируса саркомы Рауса (RSV), (необязательно с энхансером RSV), промотор цитомегаловируса (CMV) (необязательно с энхансером CMV), промотор SV40, промотор дигидрофолатредуктазы, промотор 13-актина, промотор фосфоглицеринкиназы (PGK) и промотор EFla.

[00120] Индуцибельные промоторы позволяют осуществлять регуляцию экспрессии генов, и их можно регулировать с помощью экзогенно поставляемых соединений, факторов окружающей среды, таких как температура, или наличия специфического физиологического состояния, например, острой фазы, конкретного состояния дифференцировки клетки или только в реплицирующихся клетках. Индуцибельные промоторы и индуцибельные системы доступны из множества коммерческих источников, включая, помимо прочего, компании Invitrogen, Clontech и Ariad. Описаны многие другие системы, которые может легко выбрать специалист в данной области техники. Примеры индуцируемых промоторов, регулируемых экзогенно поставляемыми промоторами, включают индуцируемый цинком промотор овечьего металлониона (MT), промотор дексаметазон (Dex)-индуцируемого вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промоторную систему полимеразы T7 (WO 98/10088); промотор экдизона насекомых (No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351 (1996)), тетрациклин-репрессируемую систему (Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992)), тетрациклин-индуцируемую систему (Gossen et al., Science, 268: 1766-1769 (1995), см. также Harvey et al. Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518 (1998)) RU486-индуцируемую систему (Wang et al., Nat. Biotech., 15:239-243 (1997) и Wang et al, Gene Ther., 4:432-441 (1997)), а также рапамицин-индуцируемую систему (Magari et al., J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997)). Другими типами индуцибельных промоторов, которые могут применяться в настоящем контексте, являются те, которые регулируются с помощью специфического физиологического состояния, например, температуры, острой фазы, конкретного состояния дифференцировки клетки или только в реплицирующихся клетках.

[00121] В другом варианте осуществления настоящего изобретения для трансгена будет применяться нативный промотор или его фрагмент. Нативный промотор можно применять, когда это желательно, для того, чтобы экспрессия трансгена имитировала нативную экспрессию. Нативный промотор можно применять, когда экспрессия трансгена должна регулироваться во времени или в процессе развития, или тканеспецифическим образом, или в ответ на специфические транскрипционные стимулы. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения другие элементы контроля нативной экспрессии, такие как элементы энхансера, сайты полиаденилирования или консенсусные последовательности Kozak, также могут применяться для имитации нативной экспрессии.

[00122] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения регуляторные последовательности придают тканеспецифичную экспрессию генов. В некоторых случаях тканеспецифичные регуляторные последовательности связывают тканеспецифичные транскрипционные факторы, которые индуцируют транскрипцию



тканеспецифичным образом. Такие тканеспецифические регуляторные последовательности (например, промоторы, энхансеры и т.д.) хорошо известны в данной области техники.

[00123] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вектор содержит интрон. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения интрон представляет собой химерный интрон, полученный из бета-актина кур и бета-глобина кроликов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения интрон представляет собой интрон мелкого вируса мышей (MVM).

[00124] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вектор содержит последовательность полиаденилирования (polyA). В данной области техники известны многочисленные примеры последовательностей полиаденилирования, такие как последовательность Poly(A) бычьего гормона роста (BGH) (см., например, номер доступа EF592533), последовательность полиаденилирования SV40 и последовательность полиаденилирования HSV TK pA.

[00125] Примеры систем, способов и действий, описанные в ранее представленных вариантах осуществления, являются иллюстративными, и в альтернативных вариантах осуществления некоторые действия могут выполняться в другом порядке, параллельно друг другу, быть полностью пропущены и/или объединены между различными примерами вариантов осуществления, и/или могут быть выполнены некоторые дополнительные действия, не отклоняясь от объема и сути различных вариантов осуществления. Соответственно, такие альтернативные варианты осуществления включены в примеры, описанные в данном документе.

[00126] Хотя конкретные варианты осуществления были подробно описаны выше, данное описание приведено только с целью иллюстрации. Поэтому следует понимать, что многие аспекты, описанные выше, не предназначены в качестве требуемых или существенных элементов, если прямо не указано иное. Изменения и эквивалентные компоненты или действия, соответствующие описанным аспектам примеров вариантов осуществления, в дополнение к описанным выше, могут быть выполнены специалистом в данной области техники, учитывая преимущество настоящего изобретения, без отступления от сути и объема вариантов его осуществления, определенных в следующей формуле изобретения, объем которой должен получать самое широкое толкование, чтобы охватить такие модификации и эквивалентные структуры.

[00127] Далее приведены примеры, иллюстрирующие конкретные признаки некоторых вариантов осуществления. Однако конкретные признаки, описанные ниже, не должны рассматриваться как ограничения объема изобретения, а скорее как примеры, эквиваленты из которых будут признаны обычными специалистами в данной области техники.

#### **ПРИМЕР**

[00128] Следующий пример приводится с тем, чтобы предоставить обычным специалистам в данной области техники полное понимание и описание того, как создавать

и применять способы по настоящему изобретению, но он не предназначен для ограничения объема того, что авторы изобретения рассматривают как свое изобретение. Были приняты меры для сохранения точности в отношении используемых чисел (например, количеств, значений температуры и *m. d.*), однако следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части являются массовыми частями, если не указано иное, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура приведена в градусах Цельсия, комнатная температура составляет около 25°C, и давление равно или близко к атмосферному.

**[00129] Отделение капсидных белков от интактных частиц AAV**

[00130] Для отделения интактных вирусных частиц AAV9, 1 мкл образца AAV вводили в колонку HILIC, как описано в таблице ниже. Результаты отделения продемонстрированы на фиг. 4. Как видно на фигуре, три капсидных белка AAV продемонстрировали полное отделение друг от друга.

[00131] В таблице 1 представлены обобщенные данные хроматографических условий, использованных для отделения капсидных белков AAV9 от интактного капсида AAV9.

Таблица 1: Краткое описание хроматографических условий

Система СВЭЖХ	Вода для ACQUITY СВЭЖХ I-класс			
Подвижная фаза	A: 0.1% TFA в воде			
	B: 0.1% TFA в ацетонитриле			
Колонка	ACQUITY СВЭЖХ $\Phi$ Гликопротеин ВЕН амид 1,7 мкм, 2,2 мм X 150 мм, часть № 186007963			
Температура колонки	60 °C $\pm$ 1 °C			
Температура автосамплера	5 °C $\pm$ 2 °C			
Градиент	Время (мин.)	Поток (мл/мин)	%A	% B
	0	0,2	15,0	85,0
	0,5	0,2	15,0	85,0
	1,0	0,2	25,0	75,0
	41,0	0,2	40,0	60,0
	42,0	0,2	100,0	0,0
	44,0	0,2	100,0	0,0
	45,0	0,2	15,0	85,0
55,0	0,2	15,0	85,0	
Длина волны обнаружения	280 мм			

[00132] По сравнению с отделением на основе RP, уникальный механизм удерживания колонки HILIC оказался на удивление эффективнее для отделения VP (см. Фиг. 4, 3A и 3B).

**[00133] Масс-спектральный анализ отделенных капсидных белков AAV**

[00134] Одним из преимуществ описанных в данном документе способов является отсутствие необходимости в пробоподготовке. 1 мкл образца вводили непосредственно в

ЖХ-МС, и анализировали полученные данные. К масс-спектрометру Q-Exactive Plus для анализа интактной массы были применены следующие параметры настройки:

Напряжение при распылении	3,5 кВ
Температура капилляра	350 °С
S-линза, RF уровень	60
Скорость потока защитного газа	40
Скорость потока вспомогательного газа	15
Внутренний CID	0,0 эВ
диапазон m/z	800-4000

[00135] На Фиг. 5A-5D продемонстрированы масс-спектры отдельных капсидных белков. Как продемонстрировано на Фиг. 5A, в VP3 была протеиновая гетерогенность.

[00136] Как продемонстрировано на Фиг. 6, высоту пика можно использовать для определения стехиометрии интактных частиц AAV.

[00137] Объем настоящего изобретения не должен ограничиваться конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Действительно, различные модификации изобретения, в дополнение к описанным в данном документе, будут очевидны специалистам в данной области техники из вышеприведенного описания и сопроводительных фигур. Подразумевается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения гетерогенности белковых компонентов вирусного капсида интактной вирусной частицы без оболочки, включающий: подвергание образца, содержащего указанную вирусную частицу, жидкостной хроматографии с гидрофильным взаимодействием (HILIC) для разделения белковых компонентов вирусного капсида указанной вирусной частицы; определение массы указанных белковых компонентов указанного вирусного капсида; сравнение указанных определенных масс указанных белковых компонентов указанного вирусного капсида с теоретическими массами, при этом отклонение одной или более указанных определенных масс указанных белковых компонентов указанного вирусного капсида от теоретических масс указывает на гетерогенность капсида.

2. Способ по п.1, где указанная гетерогенность включает один или более из смешанных серотипов, вариантов капсидов, аминокислотных замен капсидного белка, укороченных капсидных белков или модифицированных капсидных белков.

3. Способ характеристики белковых компонентов вирусного капсида интактной вирусной частицы без оболочки, включающий: подвергание образца, содержащего указанную вирусную частицу, жидкостной хроматографии с гидрофильным взаимодействием (HILIC) для разделения белковых компонентов указанного вирусного капсида указанного вируса. частица, где указанные белковые компоненты контролируются с помощью детектора флуоресценции; и определение массы указанных белковых компонентов указанного вирусного капсида для идентификации указанных белковых компонентов, разделенных указанным HILIC.

4. Способ по п.3, в котором подвижная фаза указанного HILIC содержит трифторуксусную кислоту, и при этом для разделения указанных белковых компонентов используется десольватирующий газ.

5. Способ по п.4, в котором указанный десольватирующий газ модифицируют легирующей добавкой, содержащей пропионовую кислоту и изопропанол.

6. Способ по п.5, в котором соотношение указанной пропионовой кислоты и указанного изопропанола составляет 3:1.

7. Способ по п.3, в котором указанный образец указанной вирусной частицы смешивают с жидкостью перед загрузкой в указанный HILIC, при этом указанная жидкость содержит один или более компонентов подвижной фазы указанного HILIC.

8. Способ по п.3, в котором указанный образец указанной вирусной частицы загружают в указанный HILIC путем многократных инъекций.

9. Способ по п.3, в котором указанный HILIC включает колонку с широкими

порами, связанную амидом.

10. Способ по п.3, дополнительно включающий определение относительного содержания указанных белковых компонентов на основе указанного разделения НПЛС, тем самым определяя стехиометрию указанных белковых компонентов указанного вирусного капсида указанной вирусной частицы.

11. Способ по п.3, дополнительно включающий сравнение указанных определенных масс указанных белковых компонентов указанного вирусного капсида с теоретическими массами, при этом отклонение одной или более указанных определенных масс указанных белковых компонентов от указанных теоретических масс указывает на гетерогенность капсида. .

12. Способ по п.11, где указанная гетерогенность капсида включает один или более из смешанных серотипов, вариантов капсидов, аминокислотных замен капсидного белка, усеченных капсидных белков или модифицированных капсидных белков.

13. Способ по п.11, где указанная гетерогенность капсида представляет собой фосфорилирование, окисление или отсечение белкового остова указанного белкового компонента.

14. Способ по п.2, где указанный белковый компонент представляет собой VP1, VP2 или VP3 частицы аденоассоциированного вируса (AAV).

15. Способ по п.3, где указанная вирусная частица содержит частицу AAV.

16. Способ по п.15, где серотипом указанной частицы AAV является AAV1, AAV2, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVDJ, AAVhu37 или его вариант.

17. Способ по п.15, где указанная частица AAV содержит вектор AAV, кодирующий гетерологичный трансген или рекомбинантный AAV.

18. Способ по п.3, где указанная вирусная частица содержит вирусный вектор, кодирующий гетерологичный трансген, или принадлежит к семейству вирусов, выбранному из группы, состоящей из Adenoviridae, Parvoviridae, Retroviridae, Vaculoviridae и Herpesviridae.

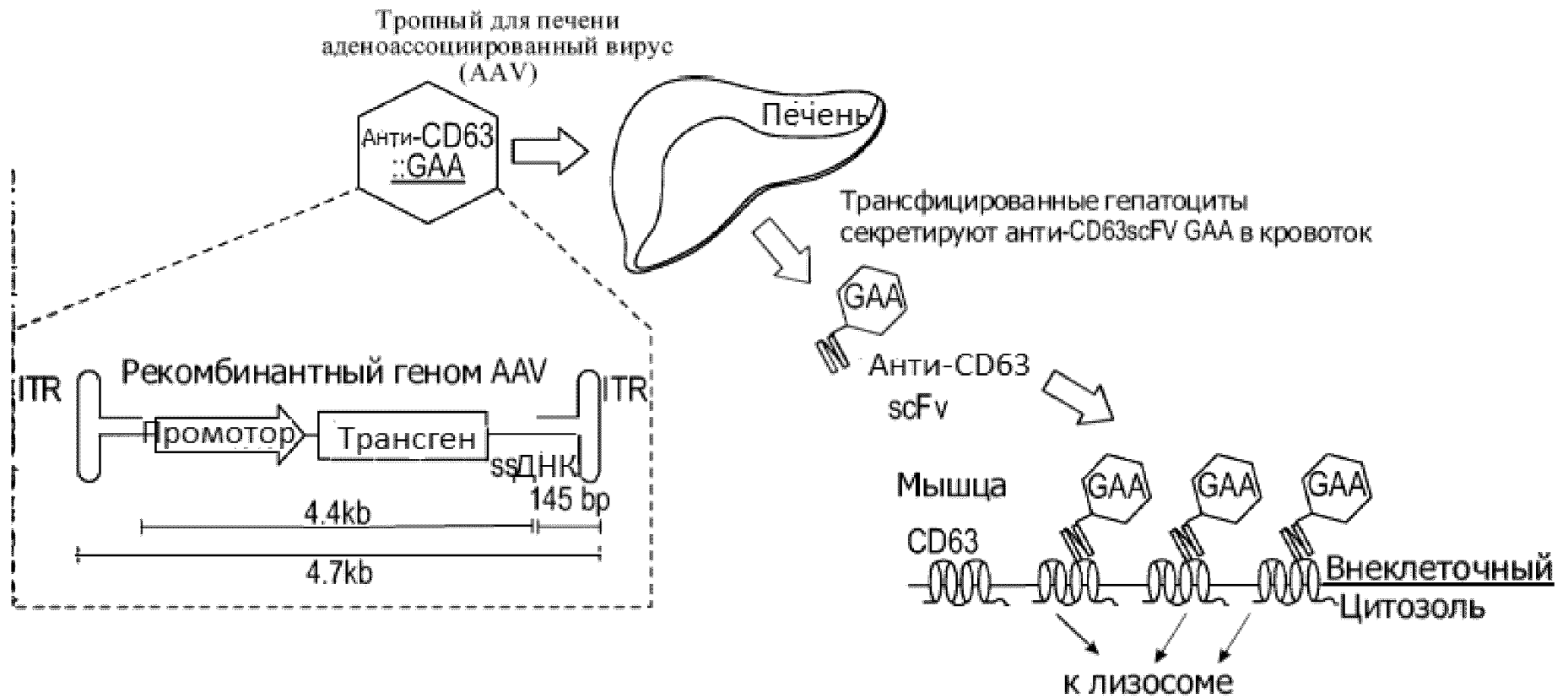
19. Способ по п.18, где указанная вирусная частица принадлежит к вирусному роду, выбранному из группы, состоящей из атаденовируса, авиаденовируса, ихтаденовируса, мастаденовируса, сияденовируса, амбиденсовируса, бревиденсовируса, гепанденсовируса, итераденсовируса, пенстилденсовируса, амдопарвовируса, авепарвовируса, бокапарвовируса, копипарвовируса. , Депендопарвовирус, Эритропарвовирус, Протопарвовирус, Тетрапарвовирус, Альфетровирус, Бетаретровирус, Дельтаретровирус, Эпсилонретровирус, Гаммаретровирус, Лентивирус, Спумавирус, Альфабакуловирус, Бетабакуловирус, Дельтабакуловирус, Гаммабакуловирус, Илтовирус,

Мардивирус, Симплексвирус, Варицелловир, Цитомегаловирус, Муромегаловирус, Нобосцивирус, Розеоловирус, Лимфокриптовирус, Макавирус, перкавирус и радиновирус.

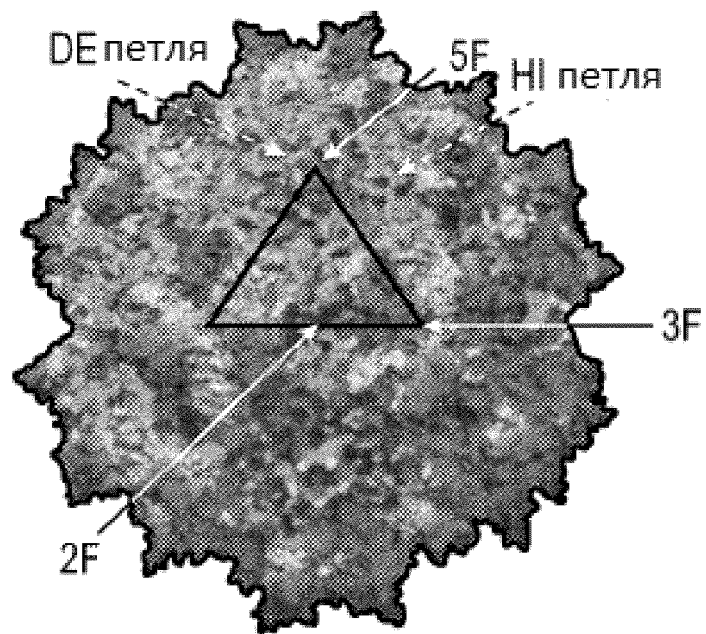
20. Способ по п.18, где указанные ретровирусы представляют собой вирус мышинной саркомы Молони (MoMSV), вирус мышинной саркомы Харви (HaMuSV), вирус опухоли молочной железы мышей (MuMTV), вирус лейкемии гиббоновых обезьян (GaLV), вирус лейкоза кошек (FLV), спамавирус, вирус Френда, вирус стволовых клеток мыши (MSCV), вирус саркомы Рауса (RSV), вирусы Т-клеточного лейкоза человека, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус иммунодефицита кошек (FIV), вирус иммунодефицита лошадей (EIV), висна-маеди вирус; вирус артрита-энцефалита коз; вирус инфекционной анемии лошадей; вирус иммунодефицита кошек (FIV); вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV); или вирус иммунодефицита обезьян (SIV).

21. Способ по п.3, в котором в указанном НПЛС используется подвижная фаза А, содержащая трифторуксусную кислоту в воде, или подвижная фаза В, содержащая трифторуксусную кислоту в ацетонитриле.

22. Способ по п.21, в котором указанная подвижная фаза А или указанная подвижная фаза В содержит около 0,1% об./об. трифторуксусной кислоты.



Фиг. 1



Фиг. 2А

VP1	VP2	VP3
34 46 115	139 161	<u>261</u> 266 328 <u>381</u> <u>447</u> 449 <u>459</u> 522 534 553 <u>573</u> <u>584</u> <u>587</u> <u>588</u> 591 664

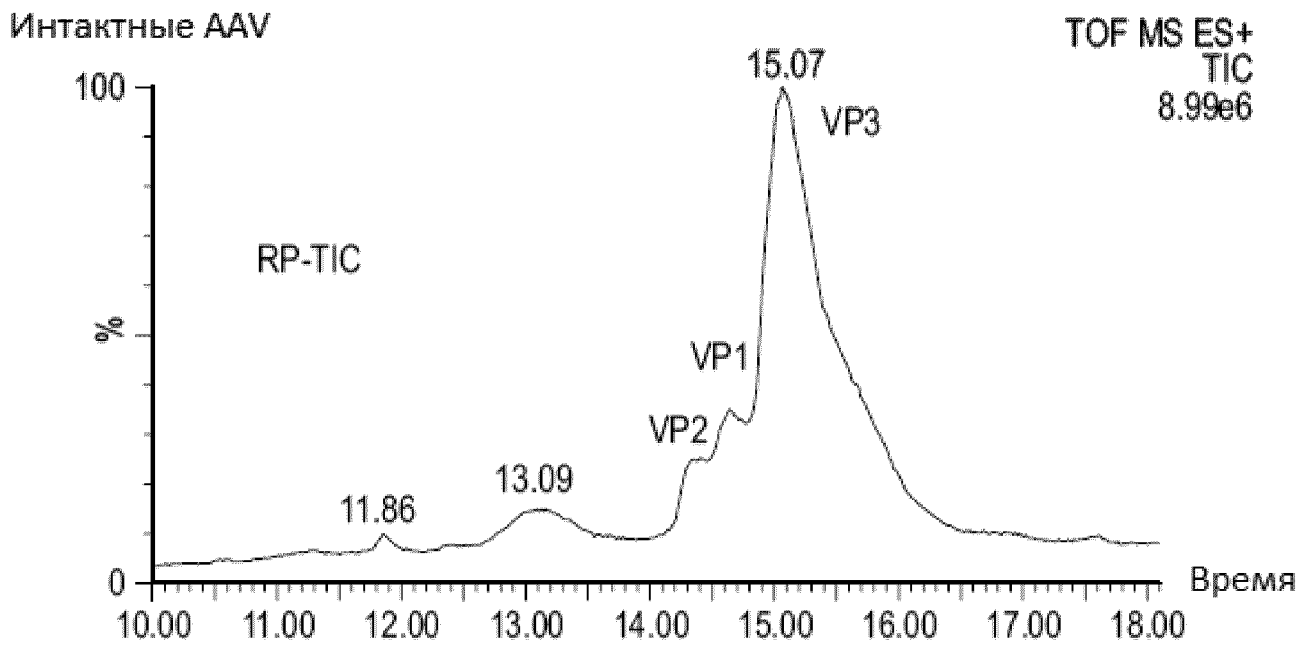
MM VP1 ~ 81.5 кДа

MM VP2 ~ 66.4 кДа

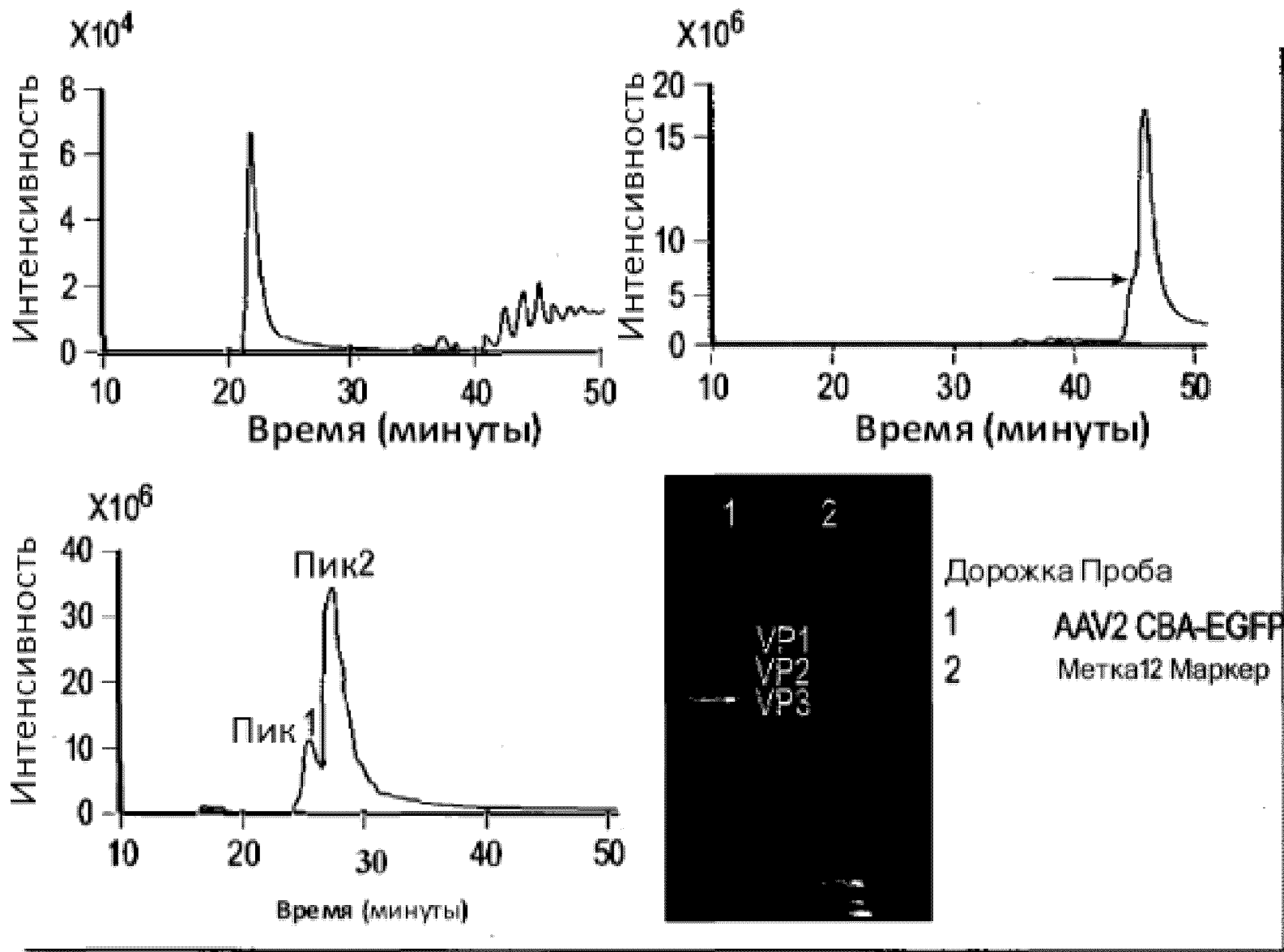
MM VP3 ~ 59.9 кДа

Фиг. 2В

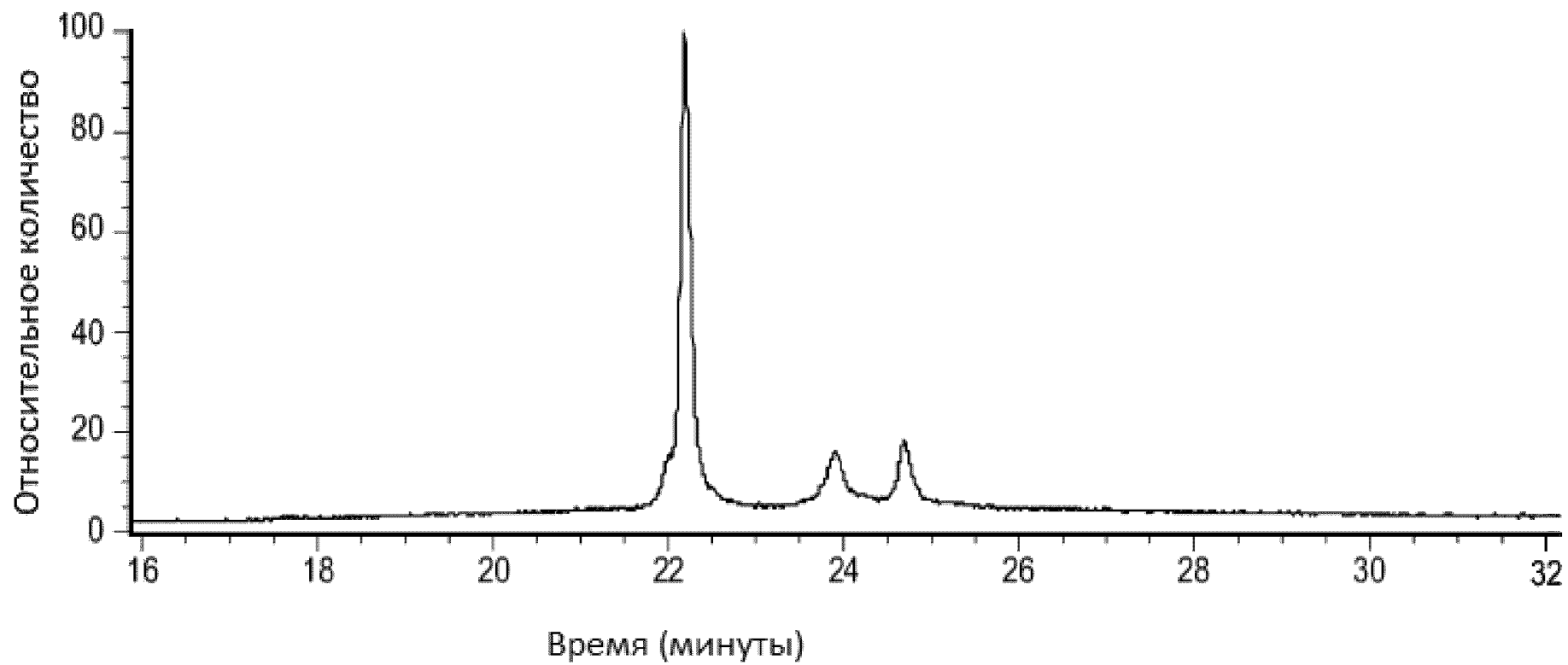




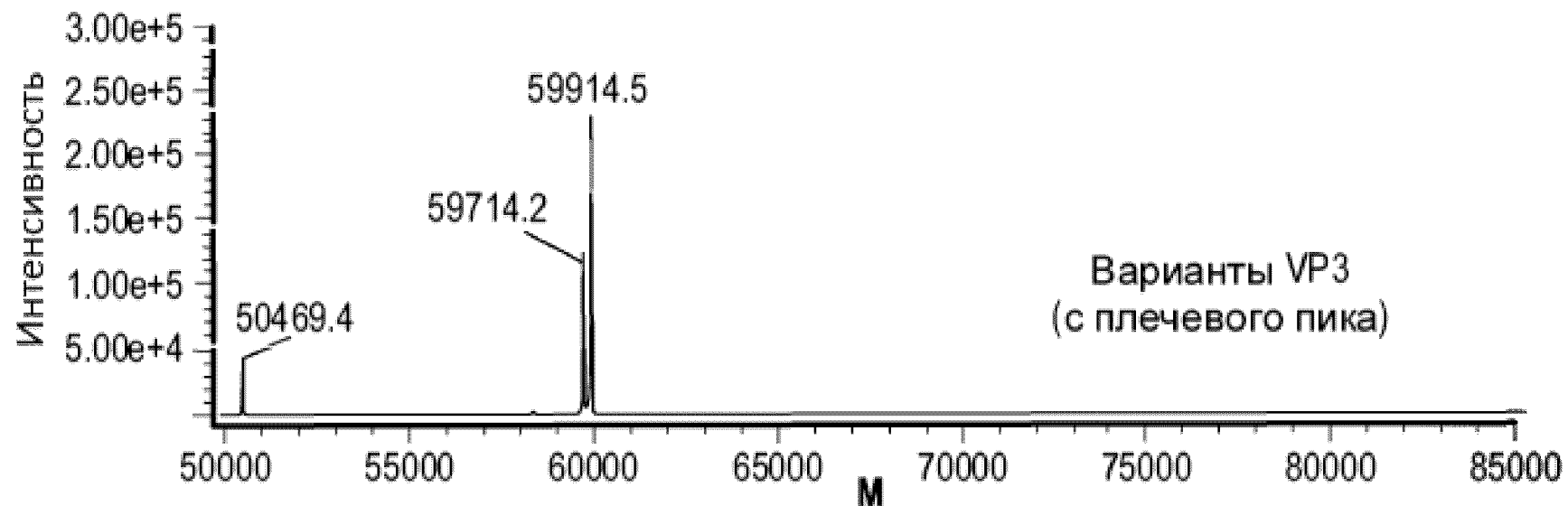
Фиг. 3А



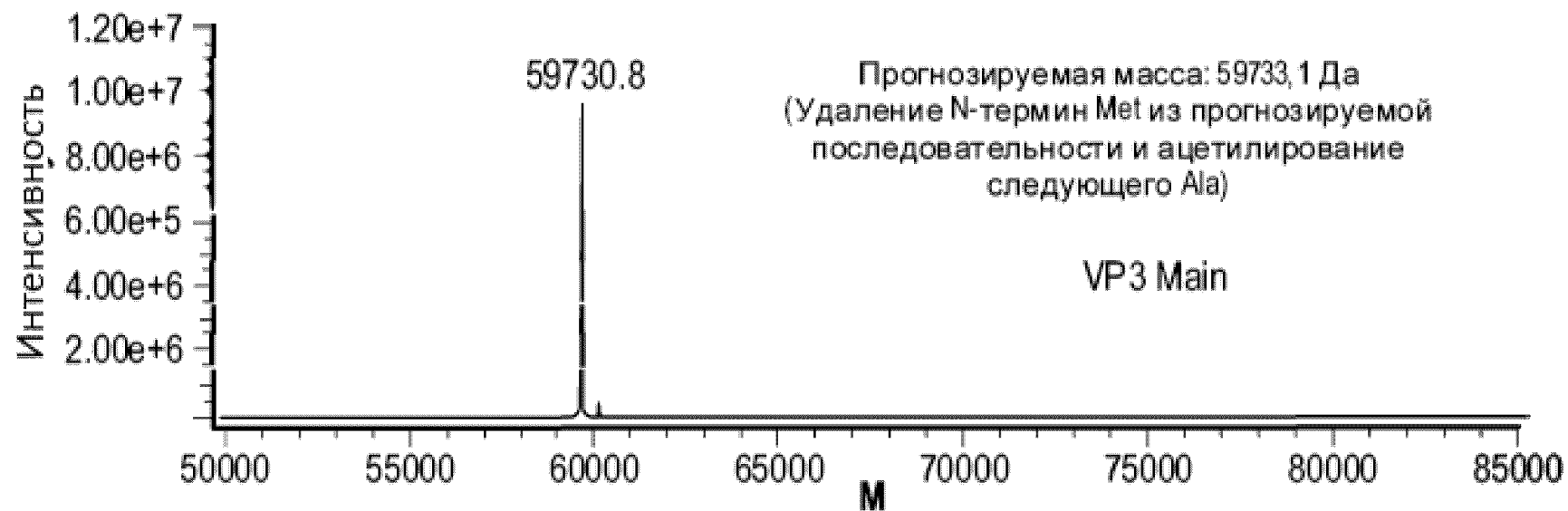
Фиг. 3В



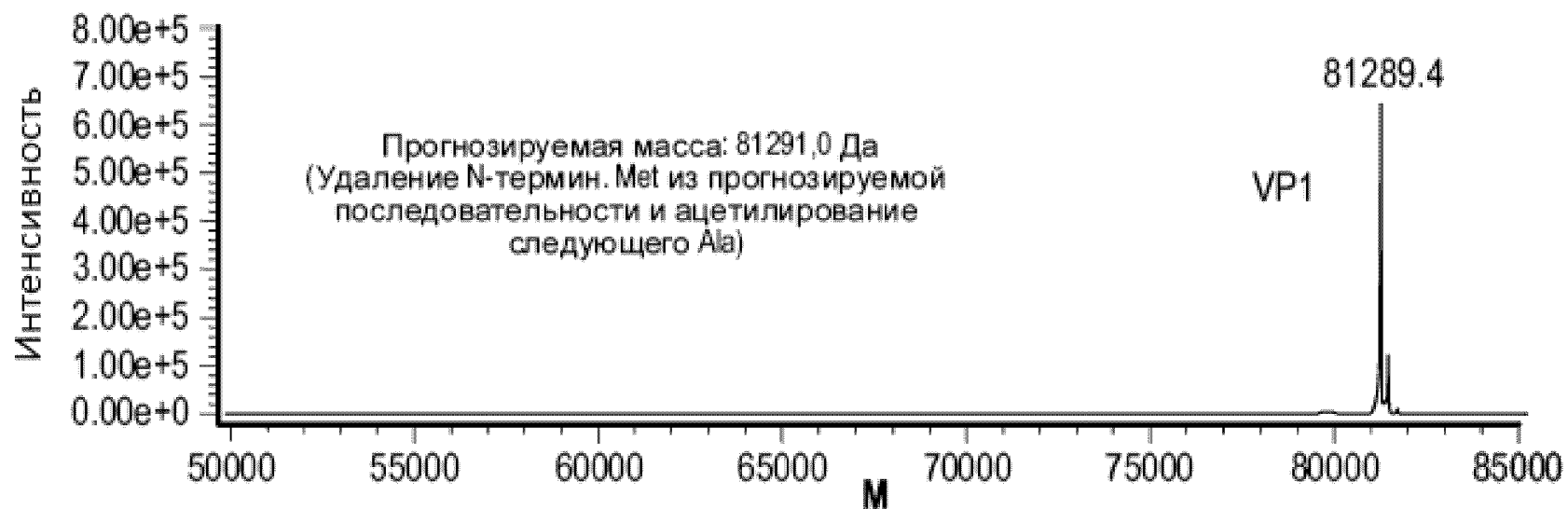
Фиг. 4



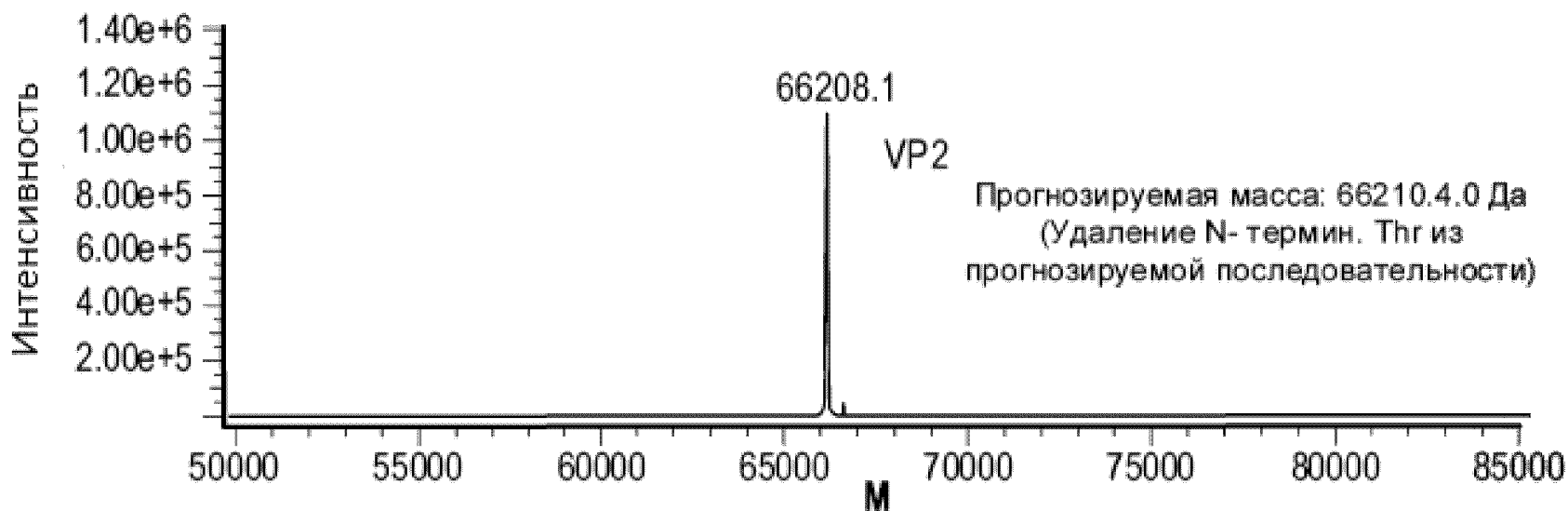
Фиг. 5А



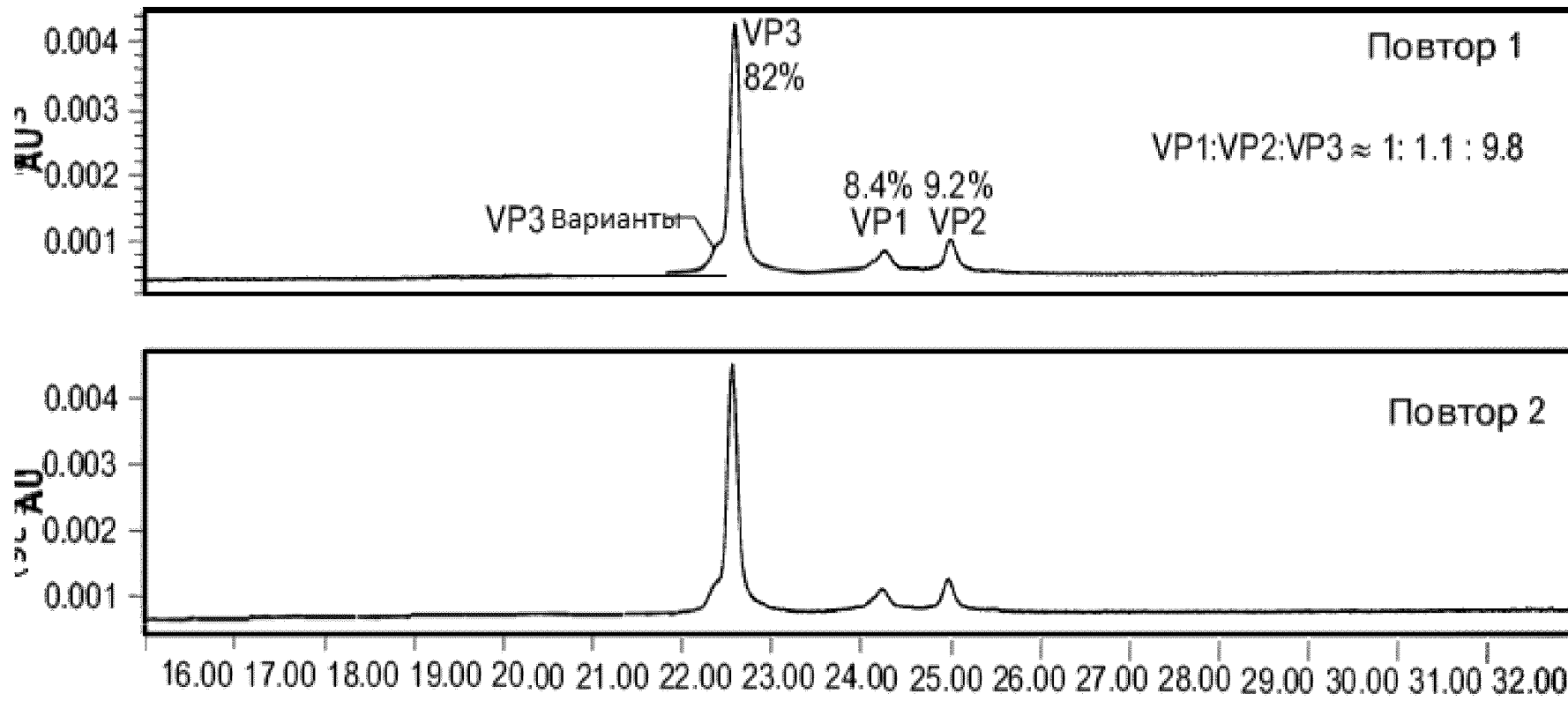
Фиг. 5В



Фиг. 5C



Фиг. 5D



Минуты

Фиг. 6

**PATENT COOPERATION TREATY**

**PCT**

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 070816-01802	<b>FOR FURTHER ACTION</b> see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2019/057936	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) 24 October 2019 (24-10-2019)	(Earliest) Priority Date ( <i>day/month/year</i> ) 25 October 2018 (25-10-2018)
Applicant  REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

**1. Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed  
 a translation of the international application into \_\_\_\_\_, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b.  This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c.  With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2.  **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3.  **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- the text is approved as submitted by the applicant  
 the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- the text is approved as submitted by the applicant  
 the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. \_\_\_\_\_  
 as suggested by the applicant  
 as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure  
 as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b.  none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2019/057936

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. G01N33/68  
ADD.  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED  
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/035059 A1 (GENZYME CORP [US]) 22 February 2018 (2018-02-22) paragraphs [0011] - [0012], [0099] -----	1-20
A	SHYTUHINA ANASTASIJA ET AL: "Development and application of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for quantitation and characterization of a Chikungunya virus-like particle vaccine", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1364, 19 June 2014 (2014-06-19), pages 192-197, XP029068394, ISSN: 0021-9673, DOI: 10.1016/J.CHROMA.2014.05.087 abstract page 195 ----- -/--	1-20

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  24 January 2020	Date of mailing of the international search report  31/01/2020
--	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Lunter, Pim
--	---------------------------------------



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2019/057936

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MARCO BENEVENTO ET AL: "Adenovirus Composition, Proteolysis, and Disassembly Studied by In-depth Qualitative and Quantitative Proteomics", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 289, no. 16, 3 March 2014 (2014-03-03), pages 11421-11430, XP055661532, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M113.537498 abstract -----	1-20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/US2019/057936
---

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018035059	A1	22-02-2018	AU 2017312951 A1	04-04-2019
			BR 112019002934 A2	14-05-2019
			CA 3033856 A1	22-02-2018
			CL 2019000392 A1	10-05-2019
			CN 110168080 A	23-08-2019
			CR 20190127 A	25-06-2019
			EP 3497207 A1	19-06-2019
			JP 2019533803 A	21-11-2019
			KR 20190039253 A	10-04-2019
			PH 12019500316 A1	05-08-2019
			SG 11201901221Y A	28-03-2019
			TW 201825898 A	16-07-2018
			WO 2018035059 A1	22-02-2018
-----				