

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202492388

(13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.11.11

(51) Int. Cl. C12Q 1/70 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2023.03.16

(54) СПОСОБЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИК ВИРУСНОГО ГЕНОМА С ПРИМЕНЕНИЕМ МОДИФИКАЦИЙ ОСНОВАНИЙ

(31) 63/320,951

(72) Изобретатель:

(32) 2022.03.17

Дэвис Стивен, Ричардсон Джаред (US)

(33) US

(74) Представитель:

(86) PCT/US2023/015345

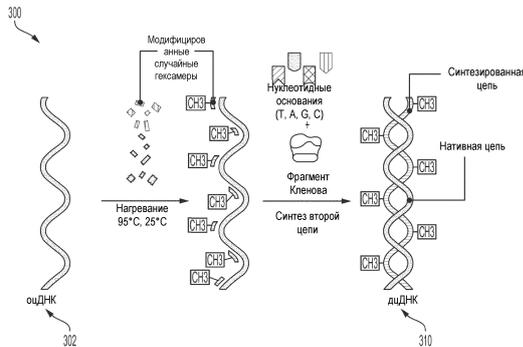
Медведев В.Н. (RU)

(87) WO 2023/177771 2023.09.21

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(57) Описаны способы анализа специфичности цепи образца вирусных частиц, содержащего одноцепочечный ДНК-геном. В вариантах реализации способы включают синтез синтетической цепи ДНК, комплементарной одноцепочечному ДНК-геному, путем встраивания модифицированного основания с получением меченого двуцепочечного ДНК-продукта, очистку меченого двуцепочечного ДНК-продукта, секвенирование очищенного двуцепочечного ДНК-продукта на секвенаторе и определение специфичности вирусного одноцепочечного ДНК-генома на основании детекции модифицированного основания синтетической цепи ДНК.



202492388

A1

A1

202492388

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-582087EA/019

СПОСОБЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИК ВИРУСНОГО ГЕНОМА С ПРИМЕНЕНИЕМ МОДИФИКАЦИЙ ОСНОВАНИЙ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] Настоящее изобретение относится к способам определения характеристик вирусного генома и его упаковки (например, генома AAV) с применением модифицированных оснований.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Аденоассоциированный вирус (AAV), представляющий собой одноцепочечный ДНК-вирус без оболочки, оказался привлекательным классом терапевтических агентов для доставки генетических материалов в клетки-хозяева для целей генной терапии благодаря способности трансдуцировать широкий спектр видов животных и тканей *in vivo*, низкого риска иммунотоксичности и незначительных врожденных и адаптивных иммунных реакций. Технология на основе рекомбинантного AAV основана на надлежащей упаковке генома, который может находиться как в смысловой, так и в антисмысловой конформациях. Стандартный способ оценки содержания ДНК, упакованной в частицы AAV, еще не известен.

[0003] Существующие способы позволяют определять характеристики структурных аномалий упаковки AAV в самокомплементарных вариантах AAV; однако они не обеспечивают глубокого анализа одноцепочечного генома AAV с учетом специфичности его цепи. Сложная природа вирусных векторов, например, AAV, требует передовых способов для обеспечения анализа и определения характеристик продукта. Таким образом, существует потребность в способах определения специфичности одноцепочечной ДНК вирусных частиц.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Настоящее изобретение относится к способу дифференцировки одноцепочечных цепей ДНК, который обеспечивает сохранение специфической информации о цепи в образце вирусных частиц (например, AAV) с применением комбинации встраивания модифицированных оснований и подхода на основе секвенирования с длинными ридами. В примерах вариантов реализации модифицированное основание, например, 5-метилцитозин (5mC), применяют для мечения одноцепочечной ДНК, которую обнаруживают с использованием платформы на основе нанопорового секвенатора, что позволяет идентифицировать специфичность секвенированной цепи. Селективное мечение одиночных цепей ДНК вирусного генома и их последующий анализ уникальным образом обеспечивают количественный контроль качества вирусной генной терапии на молекулярном уровне и увеличивают разрешающую способность анализа одноцепочечных вирусных конструкций.

[0005] В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ анализа специфичности цепи в образце вирусных частиц, содержащих одноцепочечный ДНК-

геном, включающий: (а) синтез синтетической цепи ДНК, комплементарной нативной цепи ДНК в образце вирусных частиц, с получением двуцепочечного ДНК-продукта, причем указанную синтетическую цепь ДНК синтезируют, встраивая в нее модифицированное основание; (b) очистку синтезированного двуцепочечного ДНК-продукта; (с) секвенирование очищенного двуцепочечного ДНК-продукта на секвенаторе, причем указанный секвенатор идентифицирует последовательность нуклеотидов в одной секвенированной цепи двуцепочечного ДНК-продукта; и (d) определение специфичности нативной цепи ДНК путем идентификации специфичности секвенированной цепи, и детекции того, содержит ли секвенированная цепь модифицированное основание, при этом наличие модифицированного основания указывает на то, что секвенированная цепь представляет собой синтетическую цепь ДНК двуцепочечного ДНК-продукта.

[0006] В некоторых вариантах реализации образец вирусных частиц содержит частицы аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых случаях частицы AAV принадлежат к серотипу AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV-DJ, AAV-DJ/8, AAV-Rh10, AAV-ретро, AAV-PHP.B, AAV8-PHP.eB или AAV-PHP.S.

[0007] В некоторых вариантах реализации модифицированное основание содержит 5-метилцитозин, 5-гидроксиметилцитозин или N6-метилдезоксаденозин. В некоторых случаях модифицированное основание представляет собой 5-метилцитозин.

[0008] В некоторых вариантах реализации включение модифицированного основания приводит к метилированию синтетической цепи ДНК.

[0009] В некоторых вариантах реализации двуцепочечный ДНК-продукт очищают с помощью магнитных гранул.

[0010] В некоторых вариантах реализации секвенатор представляет собой нанопоровый секвенатор.

[0011] В некоторых вариантах реализации нанопоровый секвенатор позволяет осуществлять введение либо нативной цепи ДНК, либо селективно меченой синтетической цепи ДНК очищенного двуцепочечного ДНК-продукта для секвенирования.

[0012] В некоторых вариантах реализации нативную цепь ДНК или селективно меченую синтетическую цепь ДНК секвенируют с применением подхода на основе секвенирования с длинными ридами.

[0013] В некоторых вариантах реализации модифицированное основание синтетической цепи ДНК детектируют путем изменения протекания тока через нанопоровый секвенатор. В некоторых случаях детектирование модифицированного основания отличает синтетическую цепь ДНК от нативной цепи ДНК при введении указанных цепей в нанопоровый секвенатор.

[0014] В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает идентификацию процентных долей смысловой цепи и антисмысловой цепи, упакованных в образце вирусных частиц, на основании детектирования модифицированного основания синтетической цепи ДНК.

[0015] В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ различения нативной цепи ДНК и синтетической цепи ДНК в образце частиц аденоассоциированного вируса (AAV), содержащих одноцепочечный ДНК-геном, включающий: (a) синтез синтетической цепи ДНК, комплементарной нативной цепи ДНК, с получением двуцепочечного ДНК-продукта, причем синтетическая цепь ДНК содержит модифицированное основание, обеспечивающее селективное мечение указанной синтетической цепи ДНК; (b) очистку двуцепочечного ДНК-продукта; (c) секвенирование очищенного двуцепочечного ДНК-продукта на нанопоровом секвенаторе; и (d) определение специфичности нативной цепи ДНК путем идентификации специфичности секвенированной цепи и детекции того, содержит ли секвенированная цепь модифицированное основание синтетической цепи ДНК, в ходе нанопорового секвенирования за счет детектирования изменения протекания тока через нанопоровый секвенатор, причем наличие модифицированного основания указывает на то, что секвенированная цепь представляет собой синтетическую цепь ДНК двуцепочечного ДНК-продукта.

[0016] В некоторых вариантах реализации модифицированное основание содержит 5-метилцитозин, 5-гидроксиметилцитозин или N6-метилдезоксаденозин. В некоторых случаях модифицированное основание представляет собой 5-метилцитозин.

[0017] В некоторых вариантах реализации селективное мечение приводит к метилированию синтетической цепи ДНК.

[0018] В некоторых вариантах реализации нативную цепь ДНК или селективно меченую синтетическую цепь ДНК секвенируют с применением подхода на основе секвенирования с длинными ридами.

[0019] В некоторых вариантах реализации двуцепочечный ДНК-продукт очищают с помощью магнитных гранул.

[0020] В некоторых вариантах реализации частицы AAV принадлежат к серотипу AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV-DJ, AAV-DJ/8, AAV-Rh10, AAV-ретро, AAV-PHP.B, AAV8-PHP.eB или AAV-PHP.S.

[0021] В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает определение ориентации секвенированной цепи на основании детекции модифицированного основания синтетической цепи ДНК.

[0022] В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает идентификацию пропорций смысловой цепи и антисмысловой цепи, упакованных в образце частиц аденоассоциированного вируса (AAV), на основании определения ориентации секвенированной цепи.

[0023] В некоторых вариантах реализации вирусные частицы содержат экзогенный ген в одноцепочечном ДНК-геноме. В некоторых случаях экзогенный ген представляет собой терапевтический ген.

[0024] В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает определение полной последовательности секвенированной цепи.

[0025] В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает идентификацию комплементарной нуклеотидной последовательности, соответствующей полной последовательности, если секвенированная цепь представляет собой синтетическую цепь ДНК двуцепочечного ДНК-продукта.

[0026] В любом из различных вариантов реализации, описанных выше или в любом месте настоящего документа, секвенирование нуклеиновой кислоты идентифицирует от приблизительно 100 до приблизительно 5000 нуклеотидов в секвенированной цепи. В некоторых случаях секвенирование идентифицирует от 100 до 1000 нуклеотидов в секвенированной цепи. В некоторых случаях секвенирование идентифицирует от 100 до 500 нуклеотидов в секвенированной цепи.

[0027] В любом из различных вариантов реализации, описанных выше или в любом месте настоящего документа, секвенирование нуклеиновой кислоты выполняют без фрагментации секвенируемой цепи.

[0028] В различных вариантах реализации любые из признаков или компонентов вариантов реализации, описанных выше или в любом месте настоящего документа, можно комбинировать, и такие комбинации включены в объем настоящего изобретения. Любое конкретное значение, рассмотренное выше или в любом месте настоящего документа, можно комбинировать с другим связанным с ним значением, рассмотренным выше или в любом месте настоящего документа, для указания диапазона, при этом указанные значения представляют верхнюю и нижнюю границы диапазона, и такие диапазоны включены в объем настоящего изобретения.

[0029] Другие варианты реализации будут очевидны после изучения приведенного ниже подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0030] На фигуре 1 представлен капсид AAV с одноцепочечным ДНК-геномом, содержащим терапевтический ген или ген, представляющий интерес (GOI).

[0031] На фигуре 2 представлен обзор примера способа анализа специфичности цепи частиц AAV в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения.

[0032] На фигуре 3 представлен способ синтеза второй цепи согласно варианту реализации настоящего изобретения, демонстрирующий встраивание модифицированного основания и селективное мечение синтетической второй цепи. «CH₃» соответствует термину «метилированный».

[0033] На фигуре 4 представлена очистка продукта синтеза второй цепи с использованием магнитных гранул.

[0034] На фигуре 5 представлено секвенирование продукта синтеза второй цепи на нанопоровом секвенаторе и определение последовательности секвенированной цепи на основании изменения протекания тока через нанопоровый секвенатор.

[0035] На фигурах 6А и 6В представлены химические структуры немодифицированного основания цитозина и модифицированного основания 5-метилцитозина, соответственно.

[0036] На фигуре 6С представлено секвенирование селективно меченых и немеченых цепей ДНК с помощью нанопорового секвенатора, причем детектирование изменения протекания тока указывает на наличие модифицированного основания 5-метилцитозина. «Me» или «CH₃» означает «метилованный».

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0037] Перед приведением описания настоящего изобретения отметим, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и условиями экспериментов, поскольку такие способы и условия могут изменяться. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, предназначена исключительно для целей описания конкретных вариантов реализации; подразумевается, что она не является ограничивающей, поскольку объем настоящего изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

[0038] Если не указано иное, все технические и научные термины в настоящем документе имеют значение, общепринятое среди специалистов в области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. В настоящем документе термин «приблизительно» при использовании в отношении конкретного указанного численного значения означает, что это значение может отличаться от указанного значения не более чем на 1%. Например, в настоящем документе выражение «приблизительно 100» включает 99 и 101, и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т. д.).

[0039] Подразумевается, что термины «включать», «включает» и «включающий» в настоящем документе являются неограничивающими и означают «содержать», «содержит» и «содержащий», соответственно.

[0040] Хотя при практической реализации или тестировании настоящего изобретения могут применяться любые способы и материалы, сходные с описанными в настоящем документе или эквивалентные им, в настоящем документе описаны предпочтительные способы и материалы. Все патенты, патентные заявки и непатентные публикации, упомянутые в настоящем описании, полностью включены в него посредством ссылки.

Избранные сокращения

[0041] AAV: Аденоассоциированный вирус

[0042] оцДНК: одноцепочечная ДНК

[0043] дцДНК: двуцепочечная ДНК

[0044] GOI: ген, представляющий интерес

[0045] ПЦР: полимеразная цепная реакция

[0046] 5mC: 5-метилцитозин

[0047] дНТФ: Дезоксирибонуклеотидтрифосфат

[0048] дАТФ: Дезоксиаденозинтрифосфат

[0049] дГТФ: Дезоксигуанозинтрифосфат

[0050] дТТФ: Дезокситимидинтрифосфат

[0051] дЦТФ: Дезоксицитидинтрифосфат

[0052] NFW: Вода, не содержащая нуклеаз

Определения

[0053] «Аденоассоциированный вирус» или «AAV» представляет собой непатогенный парвовирус с одноцепочечным ДНК-геном размером приблизительно 4,7 кб, не имеющий оболочки и характеризующийся икосаэдрической конформацией. AAV был впервые обнаружен в 1965 году как агент, загрязняющий препараты аденовируса. AAV принадлежит к роду *Dependovirus* и семейству *Parvoviridae*, для его репликации требуются функции вируса-помощника, которым может являться герпесвирус или аденовирус. В отсутствие вируса-помощника AAV может переходить в латентное состояние путем интеграции в хромосому 19 человека в положении 19q13.4. Геном AAV состоит из двух открытых рамок считывания (ОРС), по одной для каждого из двух генов AAV - Rep и Cap. Концы ДНК AAV несут инвертированный концевой повтор (ИКП) размером 145 п. о., причем 125 концевых оснований являются палиндромными, что приводит к образованию характерной Т-образной шпилечной структуры.

[0054] В настоящем документе термин «образец» относится к смеси вирусных частиц (например, частиц AAV), содержащей по меньшей мере один компонент капсида вируса, инкапсулирующий одноцепочечный ДНК-геном, который подвергают манипуляциям в соответствии со способами согласно настоящему изобретению, включая, например, селективное мечение и секвенирование.

[0055] В настоящем документе термин «нуклеиновая кислота» относится к полимерной форме нуклеотидов -(рибонуклеотидов либо дезоксирибонуклеотидов) любой длины. Таким образом, данный термин включает одноцепочечные, двуцепочечные и многоцепочечные ДНК или РНК, геномную ДНК, кДНК, гибриды ДНК-РНК и полимеры, содержащие пуриновые и пиримидиновые основания или другие природные, химически или биохимически модифицированные, неприродные или дериватизированные нуклеотидные основания, но не ограничивается ими. Остов нуклеиновой кислоты может содержать углеводы и фосфатные группы (которые обычно содержатся в РНК или ДНК), или модифицированные или замещенные углеводные или фосфатные группы.

[0056] «Рекомбинантная вирусная частица» относится к вирусной частице, содержащей один или более экзогенных генов или гетерологичных последовательностей (например, нуклеотидную последовательность невирусного происхождения), которые могут быть фланкированы по меньшей мере одной вирусной нуклеотидной последовательностью.

[0057] Термин «частица рекомбинантного AAV» относится к частице аденоассоциированного вируса, содержащей одну или более гетерологичных последовательностей (например, нуклеотидную последовательность, происходящую не из AAV), которые могут быть фланкированы по меньшей мере одной, например, двумя последовательностями инвертированных концевых повторов (ИКП) AAV. Такие частицы rAAV могут быть реплицированы и упакованы, если они присутствуют в клетке-хозяине, инфицированной подходящим вирусом-помощником (или экспрессирующей подходящие

функции вируса-помощника) и экспрессирующей продукты генов гер и сар AAV (т. е. белки Rep и Cap AAV).

[0058] «Вирусная частица» относится к вирусной частице, состоящей из по меньшей мере одного вирусного капсидного белка и инкапсулированного вирусного генома.

[0059] «Гетерологичный» или «экзогенный» означает полученный из объекта, генотипически отличающегося от остальной части объекта, с которым его сравнивают, или в который его вводят или встраивают. Например, нуклеиновая кислота, которую вводят с помощью методик генной инженерии в клетку другого типа, представляет собой гетерологичную нуклеиновую кислоту (и при экспрессии может кодировать гетерологичный полипептид). Аналогичным образом, последовательность, полученная из клетки (например, ген или его фрагмент), встроенная в вирусную частицу, представляет собой гетерологичную или экзогенную нуклеотидную последовательность по отношению к вирусной частице.

[0060] Термин «терапевтический ген» относится к генетически модифицированному гену, который обеспечивает терапевтический эффект (например, за счет кодирования белка, представляющего интерес) или лечение заболевания путем репарации или восстановления дефектного генетического материала.

[0061] Последовательность «инвертированного концевого повтора» или «ИКП» представляет собой относительно короткую последовательность, находящуюся на концах вирусных геномов, имеющих противоположную ориентацию. Последовательность «инвертированного концевого повтора (ИКП) AAV» представляет собой последовательность размером приблизительно 145 нуклеотидов, которая присутствует на обоих концах одноцепочечного генома AAV.

[0062] В настоящем документе термин «выделенный» относится к биологическому компоненту (например, нуклеиновой кислоте, пептиду, белку, липиду, вирусной частице или метаболиту), по существу отделенному, продуцированному отдельно или очищенному от других биологических компонентов, присутствующих в клетке организма, в котором данный компонент встречается или трансгенно экспрессируется.

[0063] В настоящем документе термин «вектор» относится к рекомбинантной плазмиде или вирусу, содержащим нуклеиновую кислоту, которую необходимо доставить в клетку-хозяина *in vitro* либо *in vivo*.

[0064] Термин «соответствующий» представляет собой относительный термин, указывающий на сходство положения, цели или структуры.

[0065] Термин «рид» в отношении секвенирования относится к нуклеотидной последовательности кластера нуклеотидов, полученной после окончания процесса секвенирования, которая по существу представляет собой последовательность части полной нуклеотидной последовательности. «Рид» представляет собой распознанные основания для строки нуклеотидов, полученной из исходного сигнала.

[0066] Термин «секвенирование с длинными ридами» относится к методике

секвенирования ДНК, которая позволяет определять последовательность нуклеотидов длинных последовательностей ДНК размером от приблизительно 100 пар оснований до приблизительно 1 000 000 пар оснований или более одновременно (верхний предел может зависеть только от секвенируемого генома), за счет чего устраняется потребность во фрагментации и амплификации ДНК, обычно необходимых при использовании других методик секвенирования ДНК. В одном примере геном AAV (размер которого составляет порядка 5000 пар оснований) можно полностью секвенировать без какой-либо фрагментации.

[0067] В настоящем документе термин «амплификация» относится к получению множества копий сегмента ДНК или РНК. Амплификация обычно индуцируется полимеразной цепной реакцией.

[0068] В настоящем документе термин «ПЦР» относится к полимеразной цепной реакции, которая представляет собой молекулярно-биологическую методику, применяемую для амплификации одной копии сегмента ДНК или РНК с получением от нескольких тысяч до нескольких миллионов копий конкретной последовательности ДНК или РНК. ПЦР обычно применяют для амплификации некоторого количества копий сегмента ДНК или РНК в целях клонирования или применения в других аналитических процедурах.

[0069] Термин «нанопоровое секвенирование» относится к секвенированию молекулы нуклеиновой кислоты в результате изменения протекания тока за счет каждого основания по мере прохождения молекулы нуклеиновой кислоты через нанопору.

[0070] Термин «специфичность цепи» относится к положительной, или смысловой цепи, и отрицательной, или антисмысловой цепи вирусного генома. Положительная, или смысловая цепь представляет собой кодирующую цепь, тогда как отрицательная, или антисмысловая цепь представляет собой некодирующую цепь гена.

Общее описание

[0071] В настоящем изобретении предложены способы синтеза и мечения синтетической цепи ДНК путем встраивания в нее модифицированного основания, причем секвенирование меченой синтетической цепи ДНК обеспечивает быструю идентификацию специфичности цепи оцДНК-генома из образца вирусных частиц (например, частиц AAV). В способах согласно настоящему изобретению применяют подход на основе секвенирования с длинными ридами на нанопоровом секвенаторе для идентификации и количественного анализа специфичности цепи вирусного генома. Количественный анализ для детекции пропорций смысловой цепи и антисмысловой цепи, упакованных в образец частиц AAV, необходим для обеспечения качества и однородности продукта, что позволяет значительно оптимизировать процесс контроля качества.

Способы идентификации и количественного анализа специфичности цепи вирусного одноцепочечного ДНК-генома

[0072] Аспекты настоящего изобретения относятся к способам идентификации и количественного анализа специфичности цепи оцДНК-генома в образце вирусных частиц

(например, частиц рекомбинантного AAV) с применением комбинации встраивания модифицированного основания и подхода на основе секвенирования с длинными ридами.

[0073] В некоторых случаях способ включает: (a) синтез синтетической цепи ДНК, комплементарной нативной цепи ДНК образца вирусных частиц, с получением двуцепочечного ДНК-продукта, причем синтетическую цепь ДНК синтезируют, встраивая в нее модифицированное основание; (b) очистку синтезированного двуцепочечного ДНК-продукта; (c) секвенирование очищенного двуцепочечного ДНК-продукта на секвенаторе, причем указанный секвенатор идентифицирует последовательность нуклеотидов в одной секвенированной цепи двуцепочечного ДНК-продукта; и (d) определение специфичности нативной цепи ДНК путем идентификации специфичности секвенированной цепи, а также детекции того, содержит ли секвенированная цепь модифицированное основание, причем наличие модифицированного основания указывает на то, что секвенированная цепь представляет собой синтетическую цепь ДНК двуцепочечного ДНК-продукта.

[0074] Частица аденоассоциированного вируса 100 вместе с ее одноцепочечным ДНК-геномом показана на фиг. 1. В примере, показанном на фиг. 1, оцДНК-геном AAV характеризуется высокой степенью симметрии и содержит палиндромные элементы. Кроме того, оцДНК-геном AAV содержит приблизительно 70% GC с инвертированными концевыми повторами. В некоторых примерах одноцепочечный ДНК-геном рекомбинантного AAV может содержать терапевтический ген или ген, представляющий интерес (GOI), например, для целей генной терапии.

[0075] Из способов, описанных в настоящем документе, пример 200 способа анализа специфичности цепи частиц AAV проиллюстрирован схематическим изображением на фиг. 2. В примере способа, показанном на фиг. 2, оцДНК-геном 204 экстрагируют или выделяют из образца частиц AAV 202. В одном примере выделенный оцДНК-геном 204 можно получить путем лизиса нуклеокапсидов и высвобождения вирусной оцДНК с применением экстракции фенол-хлороформом, тогда как в других примерах выделенный оцДНК-геном 204 можно получить путем экстракции с щелочным лизисом. На выделенном оцДНК-геноме 204 затем проводят синтез синтетической цепи ДНК или синтез второй цепи с встраиванием модифицированного основания, получая селективно меченую двуцепочечную ДНК 206. Меченую двуцепочечную ДНК 206 очищают от компонентов реакции синтеза второй цепи. В одном примере очистка двуцепочечной ДНК 206 может быть выполнена с использованием магнитных гранул. Затем очищенную двуцепочечную ДНК 206 секвенируют на нанопоровом секвенаторе 208, причем указанный секвенатор идентифицирует последовательность нуклеотидов в одной секвенированной цепи двуцепочечного ДНК-продукта. Более подробная информация о синтезе второй цепи, очистке меченой двуцепочечной ДНК и нанопоровом секвенировании представлена на следующих фигурах.

[0076] Пример синтеза второй цепи 300 в различных вариантах реализации способов, обсуждаемых в настоящем документе, показан на фиг. 3. Нативную цепь оцДНК 302 (которая может быть аналогична оцДНК-геному 204 на фиг. 2) можно

использовать в качестве матрицы для синтеза синтетической цепи ДНК, комплементарной нативной цепи оцДНК 302. Синтез второй цепи катализируется фрагментом Кленова в присутствии нуклеотидных оснований и модифицированных случайных гексамеров. В реакции синтеза второй цепи используют модифицированное основание для селективного мечения синтетической цепи ДНК. В различных вариантах реализации способа модифицированное основание содержит 5-метилцитозин, 5-гидроксиметилцитозин или N6-метилдезоксаденозин. В некоторых случаях модифицированное основание представляет собой 5-метилцитозин. Синтез второй цепи приводит к образованию двуцепочечного ДНК-продукта 310, содержащего метилированную (СН3) синтетическую цепь ДНК, как показано на фиг. 3.

[0077] Затем меченый двуцепочечный ДНК-продукт 310 очищают от компонентов реакции синтеза второй цепи. Типичный способ очистки 400 показан на фиг. 4, где продемонстрирована очистка меченого двуцепочечного ДНК-продукта 310 с использованием магнитных гранул 410. Меченый дцДНК-продукт 310 конъюгируют с магнитными гранулами 410 и отделяют от компонентов реакции синтеза второй цепи с использованием магнита. Затем меченый дцДНК-продукт 310 промывают и элюируют с магнитных гранул 410.

[0078] В вариантах реализации способов, обсуждаемых в настоящем документе, очищенный двуцепочечный ДНК-продукт в конечном итоге подвергают секвенированию. Как показано на фиг. 5, секвенирование 500 продукта синтеза второй цепи выполняют на нанопоровом секвенаторе 502 с использованием технологий с длинными ридами, которые обеспечивают получение одиночных ридов длиной от приблизительно 100 пар оснований до 1000 кб или более. Как показано, нанопора 504 нанопорового секвенатора 502 идентифицирует последовательность нуклеотидов в одной секвенированной цепи двуцепочечного ДНК-продукта. Идентификация нуклеотидной последовательности секвенированной цепи основана на способности каждого нуклеотидного основания уникальным образом изменять протекание тока при прохождении через нанопору 504. График 506, на котором показано каждое основание, изменяющее протекание электрического тока с течением времени, приведен на фиг. 5. В примерах двуцепочечный ДНК-продукт не нужно фрагментировать для секвенирования, что позволяет получать риды длиной вплоть до всего вирусного генома (например, AAV). В различных вариантах реализации количество нуклеотидов, секвенированных без фрагментации, составляет от приблизительно 100 до приблизительно 1000000. В некоторых случаях количество нуклеотидов, секвенированных без фрагментации, составляет от приблизительно 100 до приблизительно 10000. В некоторых случаях количество нуклеотидов, секвенированных без фрагментации, составляет от приблизительно 100 до приблизительно 9000, до приблизительно 8000, до приблизительно 7000, до приблизительно 6000 или до приблизительно 5000 (например, нуклеотидов в секвенированной цепи).

[0079] Полученные данные секвенирования анализируют на предмет присутствия модифицированного основания в секвенированной цепи дцДНК-продукта. Химические

структуры немодифицированного нуклеинового основания цитозина и модифицированного нуклеинового основания 5-метилцитозина с дополнительной метильной группой (CH₃) изображены на фиг. 6А и 6В, соответственно. И модифицированные, и немодифицированные нуклеиновые основания по-разному изменяют протекание тока через нанопору. Как показано на фиг. 6С, детектирование модифицированного основания в ходе секвенирования указывает на то, что секвенированная цепь представляет собой синтетическую цепь ДНК двуцепочечного ДНК-продукта, поскольку синтетическая цепь ДНК является модифицированной (например, метилированной). В то же время отсутствие модифицированного основания в ходе секвенирования указывает на то, что секвенированная цепь представляет собой нативную цепь ДНК двуцепочечного ДНК-продукта, поскольку нативная цепь ДНК является неметилированной. График 610, на котором показано изменение протекания электрического тока с течением времени, соответствующее метилированной (модифицированной) и неметилированной (немодифицированной) цепям, приведен на фиг. 6С.

[0080] Способы, обсуждаемые в настоящем документе, включают определение специфичности нативной цепи ДНК путем идентификации специфичности секвенированной цепи. Специфичность нативной цепи ДНК генома AAV можно определить путем идентификации комплементарной нуклеотидной последовательности, соответствующей полной последовательности, если секвенированная цепь представляет собой синтетическую цепь ДНК двуцепочечного ДНК-продукта. Кроме того, можно идентифицировать пропорцию и смысловой цепи, и антисмысловой цепи, упакованных в образец частиц AAV, на основании детекции модифицированного основания синтетической цепи ДНК.

Вирусные частицы

[0081] В определенных аспектах вирусная частица представляет собой частицу AAV, и описанные способы можно применять для определения специфичности оцДНК-генома и идентификации долей смысловой цепи и антисмысловой цепи, упакованных в образец частиц AAV. Частицы AAV могут представлять собой частицы рекомбинантного AAV (rAAV). Частица rAAV содержит вектор на основе AAV, кодирующий гетерологичный трансген или гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты. **[0082]** В определенных аспектах частицы AAV включают 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 AAV12 или его вариант. В определенных аспектах частицы AAV принадлежат к серотипу AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV-DJ, AAV-DJ/8, AAV-Rh10, AAV-ретро, AAV-PHP.B, AAV8-PHP.eB или AAV-PHP.S. В некоторых вариантах реализации частицы AAV принадлежат к серотипу AAV1 или AAV8. **[0083]** Хотя AAV являлся модельной вирусной частицей для настоящего изобретения, предполагается, что описанные способы можно применять для определения характеристик различных вирусов, например,

различных семейств, подсемейств и родов вирусов. Способы согласно настоящему изобретению могут находить применение, например, для определения характеристик вирусных частиц с целью мониторинга или детекции относительного содержания смысловой цепи и антисмысловой цепи, упакованных в композицию вирусных частиц, в ходе получения, очистки или хранения таких композиций. [0084] В примерах вариантов реализации вирусная частица принадлежит к семейству вирусов, выбранному из группы, состоящей из Parvoviridae. [0085] В определенных аспектах вирусная частица принадлежит к роду вирусов, выбранному из группы, состоящей из Ambidensovirus, Brevidensovirus, Hepadensovirus, Iteradensovirus, Penstylidensovirus, Amdoparvovirus, Aveparvovirus, Восарparvovirus, Copiparvovirus, Dependoparvovirus, Erythroparvovirus, Protoparvovirus и Tetraparvovirus. [0086] В некоторых аспектах вирусная частица (например, частица AAV) содержит гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты или экзогенный ген (например, терапевтический ген или ген, представляющий интерес). В некоторых аспектах гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с промотором. Примеры промоторов включают немедленный ранний промотор цитомегаловируса (ЦМВ), RSV LTR, MoMLV LTR, промотор фосфоглицераткиназы-1 (PGK), промотор вируса обезьян 40 (SV40) и промотор СК6, промотор транстиретина (TTR), промотор ТК, тетрациклин-чувствительный промотор (TRE), промотор HBV, промотор hAAT, промотор LSP, химерные промоторы, специфичные в отношении печени (LSP), промотор E2F, промотор теломеразы (hTERT); энхансер цитомегаловируса/промотор бета-актина курицы/промотор бета-глобина кролика и промотор фактора элонгации-1-альфа (EF1-альфа), но не ограничиваются перечисленным. В некоторых аспектах промотор содержит промотор бета-глюкуронидазы человека или энхансер цитомегаловируса, связанный с промотором бета-актина курицы (CBA). Промотор может представлять собой конститутивный, индуцируемый или репрессируемый промотор. В некоторых аспектах настоящего изобретения предложен рекомбинантный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую гетерологичный трансген согласно настоящему изобретению, функционально связанный с промотором CBA. В некоторых случаях для трансгена используют нативный промотор или его фрагмент. Нативный промотор можно использовать, если необходимо, чтобы экспрессия трансгена имитировала нативную экспрессию. Нативный промотор можно использовать, если необходимо регулировать экспрессию трансгена с течением времени или в процессе развития, или тканеспецифическим образом, или в ответ на специфические транскрипционные стимулы. В дополнительном аспекте для имитации нативной экспрессии также можно применять другие нативные элементы контроля экспрессии, например, энхансерные элементы, сайты полиаденилирования или консенсусные последовательности Козак.

ПРИМЕРЫ

[0087] Следующие примеры представлены для предоставления специалистам в данной области техники полного раскрытия и описания получения и применения

способов и композиций согласно настоящему изобретению; они не предполагают ограничения объема изобретения, заявленного авторами. Авторы настоящего изобретения приложили усилия для обеспечения точности приведенных численных значений (например, количеств, температуры и т. п.), однако следует учитывать определенные экспериментальные погрешности и отклонения. Если не указано иное, то части являются массовыми частями, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, а давление является атмосферным или близким к атмосферному.

Пример 1: Определение характеристик вирусного оцДНК-генома частиц AAV

[0088] Образцы AAV различных серотипов получали самостоятельно. Общую нуклеиновую кислоту (оцДНК-геном) экстрагировали из AAV, культивируемого в клетках-хозяевах человека. На экстрагированной нуклеиновой кислоте проводили синтез второй цепи, встраивая модифицированное основание, с получением меченого дцДНК-продукта. дцДНК-продукт очищали от компонентов реакции синтеза второй цепи с применением гранул Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). Секвенирование очищенного дцДНК-продукта выполняли на нанопоровом секвенаторе GridION (Oxford Nanopore Technologies), данные анализировали с применением биоинформационного анализа.

Химические вещества и реагенты

[0089] Если не указано иное, все химические вещества и реагенты приобретали в MilliporeSigma (Берлингтон, штат Массачусетс, США). Образцы AAV и экстракт их нуклеиновой кислоты получали самостоятельно (Regeneron Pharmaceuticals Inc., Тарритаун, штат Нью-Йорк, США). Гранулы Agencourt AMPure XP приобретали в ASTM Coulter (Индианаполис, штат Индиана, США). Sigma-Aldrich этанол 200 крепости для молекулярной биологии приобретали в MilliporeSigma. Набор для прайминга проточной ячейки Oxford Nanopore Technology Flow Cell Priming Kit и набор для быстрого секвенирования Oxford Nanopore Technology Rapid Sequencing Kit приобретали в Oxford Nanopore Technologies (Оксфорд, Великобритания). Пробирки DNA/RNA LoBind объемом 1,5 мл получали от VWR (Атланта, штат Джорджия, США). Отдельные дНТФ от NEB и модифицированные 5mC дЦТФ от NEB приобретали в Thermo Fisher Scientific (Уолтем, штат Массачусетс, США). Модифицированные случайные гексамеры приобретали в Integrated DNA Technologies (Корвилль, штат Айова, США).

Эксперимент по синтезу второй цепи

[0090] Реакцию синтеза второй цепи выполняли с использованием экстракта общей нуклеиновой кислоты AAV. Мастер-микс дНТФ получали с использованием каждого из дАТФ, дТТФ, дГТФ и дЦТФ (5mC) в рабочей концентрации 10 мМ. Реакционную смесь готовили на воде, не содержащей нуклеаз. В реакционную смесь добавляли 1 мкг экстракта общей нуклеиновой кислоты, 10 мМ мастер-микса дНТФ и 60 мкМ модифицированного случайного гексамера (праймера). Реакционную смесь нагревали до 95 °С в течение трех минут, а затем оставляли для постепенного охлаждения при

комнатной температуре в течение 10 минут. Затем в реакционную смесь добавляли 2 ед/мкл фермента Кленова и инкубировали реакционную смесь в течение 1 часа при 30 °С. Реакцию синтеза второй цепи останавливали путем инкубирования реакционной смеси при 75 °С в течение 10 мин.

Очистка продукта синтеза второй цепи

[0091] Компоненты реакции синтеза второй цепи помещали в пробирку DNA/RNA LoBind объемом 1,5 мл перед процедурой очистки. Очистку дцДНК-продукта от компонентов реакции синтеза второй цепи выполняли с применением гранул Agencourt AMPure XP (магнитных гранул). дцДНК-продукт вначале конъюгировали с магнитными гранулами путем добавления ресуспендированных гранул AMPure XP к компонентам реакции синтеза второй цепи в соотношении 1:1. Смесь магнитных гранул и компонентов реакции синтеза второй цепи инкубировали на смесителе, настроенном на умеренное встряхивание, в течение 5 минут и затем центрифугировали в течение непродолжительного времени. Затем пробирку, содержащую смесь магнитных гранул и компонентов реакции синтеза второй цепи, помещали в магнитный штатив на 3 минуты, пока магнитные гранулы не окажутся на стенках пробирки. Супернатант утилизировали, не трогая магнитные гранулы. Первую промывку этанолом выполняли путем ресуспендирования магнитных гранул, конъюгированных с дцДНК, в 80% этаноле. Затем пробирку снова помещали в магнитный штатив на 3 минуты, пока магнитные гранулы не окажутся на стенках пробирки, и утилизировали супернатант, не трогая магнитные гранулы. Магнитные гранулы, конъюгированные с дцДНК, второй раз промывали этанолом с использованием 80% этанола аналогичным образом. Наконец, дцДНК элюировали с магнитных гранул путем ресуспендирования гранул в воде, не содержащей нуклеаз, при осторожном перемешивании или встряхивании в течение 5 минут. Пробирку, содержащую NFW и магнитные гранулы, центрифугировали в течение непродолжительного времени и помещали на магнитный штатив на 5 минут, пока гранулы не образовывали осадок на стенках пробирки, а водный раствор, содержащий ампликоны, не становился прозрачным. Затем водный раствор (элюат) удаляли и переносили в 0,2 мл пробирку для ПЦР для хранения, а магнитные гранулы утилизировали.

Нанопоровое секвенирование очищенного продукта синтеза второй цепи

[0092] Секвенирование очищенного дцДНК-продукта выполняли на нанопоровом секвенаторе GridION (Oxford Nanopore Technologies, Оксфорд, Великобритания). Секвенатор GridION и проточную ячейку подготавливали к секвенированию, аккуратно размещая проточную ячейку в специальном гнезде GridION. Проверляли, что количество активных пор для секвенирования составляет 1000 или более. Прайминг проточной ячейки проводили с использованием набора для прайминга проточной ячейки (Oxford Nanopore Technologies, Оксфорд, Великобритания) и проверяли на предмет отсутствия внесенных пузырьков воздуха в потоке жидкости. После того, как проточная ячейка оставалась в состоянии покоя в течение по меньшей мере 15 минут, крышку порта для образца SpotON осторожно поднимали для получения доступа к порту для образца

SpotON. Затем очищенный дцДНК-продукт подготавливали к секвенированию с получением библиотеки матриц для секвенирования. Вкратце, 1000 нг очищенного дцДНК-продукта фрагментировали до среднего размера ~800 пар оснований, проводили репарацию концов и лигировали с адаптерами для секвенирования с применением набора для быстрого секвенирования Rapid Sequencing Kit (Oxford Nanopore Technologies, Оксфорд, Великобритания). Библиотеку матриц для секвенирования смешивали со смесью для загрузки проточной ячейки, и весь объем смеси по каплям добавляли в проточную ячейку секвенатора через порт для образца SpotON, обеспечивая отсутствие пузырьков воздуха. Крышку порта для образца SpotON осторожно возвращали на место, порт для заправки проточной ячейки закрывали и начинали секвенирование на нанопоровом секвенаторе с использованием стандартных протоколов. Секвенирование автоматически останавливалось по истечении 48 часов.

Анализ данных

[0093] После остановки секвенирования файлы FASTQ переносили на облачную платформу инфраструктуры AWS для биоинформационного анализа. Полученные данные секвенирования анализировали на предмет присутствия модифицированных оснований в секвенированной цепи дцДНК-продукта. Показатели нанопорового секвенирования включали абсолютную силу тока в заданный момент времени, продолжительность поддержания указанного показателя силы тока, продолжительность времени, в течение которого показатель силы тока указывал, что область детекции не содержит нуклеиновых оснований, продолжительность времени между показателями силы тока, указывающими на конкретное основание, величину изменения по сравнению с исходным показателем силы тока и величину изменения по сравнению с предыдущим в последовательности показателем силы тока.

Результаты и обсуждение

[0094] Пример способа (схема которого показана на фиг. 2) применяли для анализа специфичности цепи частиц AAV. Указанный способ включал синтез второй цепи выделенного оцДНК-генома частиц AAV (фиг. 3), очистку с помощью магнитных гранул продукта синтеза второй цепи (фиг. 4) и нанопоровое секвенирование продукта синтеза второй цепи в течение 48 часов (фиг. 5). После секвенирования определяли специфичность выделенного одноцепочечного генома AAV путем идентификации специфичности секвенированной цепи (фиг. 6А, 6В и 6С).

[0095] В ходе реакции синтеза второй цепи синтезировали синтетическую цепь ДНК, комплементарную нативной цепи выделенного оцДНК-генома AAV. В реакцию синтеза второй цепи включали модифицированное основание (5mC-дЦТФ), что приводило к метилированию синтетической цепи ДНК и к селективному мечению синтетической цепи ДНК. Таким образом, данная реакция приводила к получению дцДНК-продукта, содержащего меченую синтетическую цепь ДНК. Мечение синтетической второй цепи обеспечивало увеличение разрешающей способности при обнаружении положительных смысловых цепей по сравнению с отрицательными

смысловыми цепями. После синтеза второй цепи меченый дцДНК-продукт очищали от реакционной смеси для синтеза второй цепи с применением магнитных гранул. Меченый дцДНК-продукт вначале конъюгировали с магнитными гранулами, а затем элюировали с них после их отделения от остальных компонентов реакции синтеза второй цепи.

[0096] При нанопоровом секвенировании очищенного дцДНК-продукта использовали технологии секвенирования с длинными ридами, которые обеспечивали получение одиночных ридов длиной от приблизительно 100 пар оснований до 1000 кб или более. В вариантах реализации очищенный двуцепочечный ДНК-продукт не требовал фрагментации для секвенирования, что позволяло получать риды длиной вплоть до полной последовательности вирусного генома (например, AAV). Длинные риды особенно пригодны для определения областей картирования коротких ридов, что способствует сборке метагеномного образца в большие непрерывные последовательности и сборке полного генома. Нанопоровый секвенатор идентифицирует последовательность нуклеотидов в одной секвенированной цепи двуцепочечного ДНК-продукта (как показано на фиг. 6С).

[0097] Реакции секвенирования единичных молекул с использованием нанопоровых сенсоров основаны на определении характеристик изменений тока в самой нанопоре, например, скорости, с которой колебания тока указывают на то, что «следующее» основание в матрице находится в области детекции поры, а также интенсивность самих колебаний тока, а также все аспекты шума, измеряемые во время этих колебаний. Каждое основание уникальным образом изменяет протекание тока по мере прохождения матрицы через нанопору (фиг. 5). Кроме того, модифицированное нуклеиновое основание в матрице также детектируют за счет изменения протекания тока через нанопору, отличающегося от его немодифицированного аналога (фиг. 6С). Кроме того, если для продвижения матрицы через нанопору используют белок (например, геликазу или полимеразу), взаимодействия белка с матрицей перед ее входом в пору могут влиять на кинетику детекции последовательности фрагмента матрицы в пределах области детекции поры. Таким образом, расположенное в направлении 5' модифицированное нуклеиновое основание может влиять на детекцию немодифицированного основания внутри нанопоры.

[0098] Полученные данные секвенирования анализировали на предмет присутствия модифицированного основания (5mC-дЦТФ) в секвенированной цепи дцДНК-продукта. Риды могут быть сгруппированы на основании сходства мотивов, содержащих модифицированное основание. Например, риды, характеризующиеся паттерном метилирования/модификации, объединяли в первую группу, а риды, не характеризующиеся паттерном метилирования/модификации, объединяли во вторую группу. Детектирование модифицированного основания или 5mC указывало на то, что секвенированная цепь представляла собой синтетическую цепь ДНК двуцепочечного ДНК-продукта, тогда как отсутствие модифицированного основания или 5mC указывало на то, что секвенированная цепь представляла собой нативную цепь ДНК двуцепочечного

ДНК-продукта (см., например, фиг. 6А, 6В и 6С).

[0099] Специфичность выделенного одноцепочечного генома AAV определяли путем идентификации комплементарной нуклеотидной последовательности, соответствующей полной последовательности, если секвенированная цепь представляла собой синтетическую цепь ДНК двуцепочечного ДНК-продукта. Кроме того, детектировали пропорции смысловой цепи и антисмысловой цепи, упакованных в образец частиц AAV, на основании детекции модифицированного основания синтетической цепи ДНК.

[0100] Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными вариантами реализации, описанными в настоящем документе. Так, различные модификации настоящего изобретения в дополнение к описанным в настоящем документе будут очевидны для специалистов в данной области техники на основании вышеизложенного описания. Предполагается, что такие модификации включены в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ анализа образца вирусных частиц, содержащих одноцепочечный ДНК-геном, на специфичность цепи, включающий:

(а) синтез синтетической цепи ДНК, комплементарной нативной цепи ДНК из образца вирусных частиц, с получением двуцепочечного ДНК-продукта, причем синтетическую цепь ДНК синтезируют путем встраивания модифицированного основания;

(b) очистку синтезированного двуцепочечного ДНК-продукта;

(с) секвенирование очищенного двуцепочечного ДНК-продукта на секвенаторе, причем секвенатор идентифицирует последовательность нуклеотидов в одной секвенированной цепи двуцепочечного ДНК-продукта; и

(d) определение специфичности нативной цепи ДНК путем идентификации специфичности секвенированной цепи и детекции того, содержит ли секвенированная цепь модифицированное основание, причем наличие модифицированного основания указывает на то, что секвенированная цепь представляет собой синтетическую цепь ДНК двуцепочечного ДНК-продукта.

2. Способ по п. 1, где образец вирусных частиц содержит частицы аденоассоциированного вируса (AAV).

3. Способ по п. 2, где частицы AAV принадлежат к серотипу AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV-DJ, AAV-DJ/8, AAV-Rh10, AAV-ретро, AAV-PHP.B, AAV8-PHP.eB или AAV-PHP.S.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где модифицированное основание содержит 5-метилцитозин, 5-гидроксиметилцитозин или N6-метилдезоксаденозин.

5. Способ по п. 4, где модифицированное основание представляет собой 5-метилцитозин.

6. Способ по п. 4 или п. 5, где встраивание модифицированного основания приводит к метилированию синтетической цепи ДНК.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где двуцепочечный ДНК-продукт очищают с помощью магнитных гранул.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где секвенатор представляет собой нанопоровый секвенатор.

9. Способ по п. 8, где нанопоровый секвенатор обеспечивает возможность введения либо нативной цепи ДНК, либо селективно меченой синтетической цепи ДНК очищенного двуцепочечного ДНК-продукта для секвенирования.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где нативную цепь ДНК или селективно меченую синтетическую цепь ДНК секвенируют с применением подхода на основе секвенирования с длинными ридами.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где модифицированное основание синтетической цепи ДНК детектируют за счет изменения протекания тока через нанопоровый секвенатор.

12. Способ по любому из пп. 8-11, где детектирование модифицированного основания позволяет отличить синтетическую цепь ДНК от нативной цепи ДНК при их введении в нанопоровый секвенатор.

13. Способ по любому из пп. 1-12, дополнительно включающий идентификацию процентной доли смысловой цепи и антисмысловой цепи, упакованных в образце вирусных частиц, на основании детекции модифицированного основания синтетической цепи ДНК.

14. Способ различения нативной цепи ДНК и синтетической цепи ДНК в образце частиц аденоассоциированного вируса (AAV), содержащих одноцепочечный ДНК-геном, включающий:

(а) синтез синтетической цепи ДНК, комплементарной нативной цепи ДНК, с получением двуцепочечного ДНК-продукта, причем синтетическая цепь ДНК содержит модифицированное основание, которое обеспечивает селективное мечение синтетической цепи ДНК;

(b) очистку двуцепочечного ДНК-продукта;

(с) секвенирование очищенного двуцепочечного ДНК-продукта на нанопоровом секвенаторе; и

(d) определение специфичности нативной цепи ДНК путем идентификации специфичности секвенированной цепи и детекции того, содержит ли секвенированная цепь модифицированное основание синтетической цепи ДНК, в ходе нанопорового секвенирования путем обнаружения изменения протекания тока через нанопоровый секвенатор, причем наличие модифицированного основания указывает на то, что секвенированная цепь представляет собой синтетическую цепь ДНК двуцепочечного ДНК-продукта.

15. Способ по п. 14, где модифицированное основание содержит 5-метилцитозин, 5-гидроксиметилцитозин или N6-метилдезоксаденозин.

16. Способ по п. 15, где модифицированное основание представляет собой 5-метилцитозин.

17. Способ по п. 15 или п. 16, где селективное мечение приводит к метилированию синтетической цепи ДНК.

18. Способ по любому из пп. 14-17, где нативную цепь ДНК или селективно меченую синтетическую цепь ДНК секвенируют с применением подхода на основе секвенирования с длинными ридами.

19. Способ по любому из пп. 14-18, где двуцепочечный ДНК-продукт очищают с помощью магнитных гранул.

20. Способ по любому из пп. 14-19, где частицы AAV принадлежат к серотипу AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV-DJ, AAV-DJ/8, AAV-Rh10, AAV-ретро, AAV-PHP.B, AAV8-PHP.eB или AAV-PHP.S.

21. Способ по любому из пп. 14-20, дополнительно включающий определение ориентации секвенированной цепи на основании обнаружения модифицированного

основания синтетической цепи ДНК.

22. Способ по п. 21, дополнительно включающий детекцию долей смысловой цепи и антисмысловой цепи, упакованных в образце частиц аденоассоциированного вируса (AAV), на основании определения ориентации секвенированной цепи.

23. Способ по любому из пп. 1-22, где вирусные частицы содержат экзогенный ген в одноцепочечном ДНК-геноме.

24. Способ по п. 23, где экзогенный ген представляет собой терапевтический ген.

25. Способ по любому из пп. 1-24, дополнительно включающий определение полной последовательности секвенированной цепи.

26. Способ по п. 25, дополнительно включающий идентификацию комплементарной нуклеотидной последовательности, соответствующей полной последовательности, если секвенированная цепь представляет собой синтетическую цепь ДНК двуцепочечного ДНК-продукта.

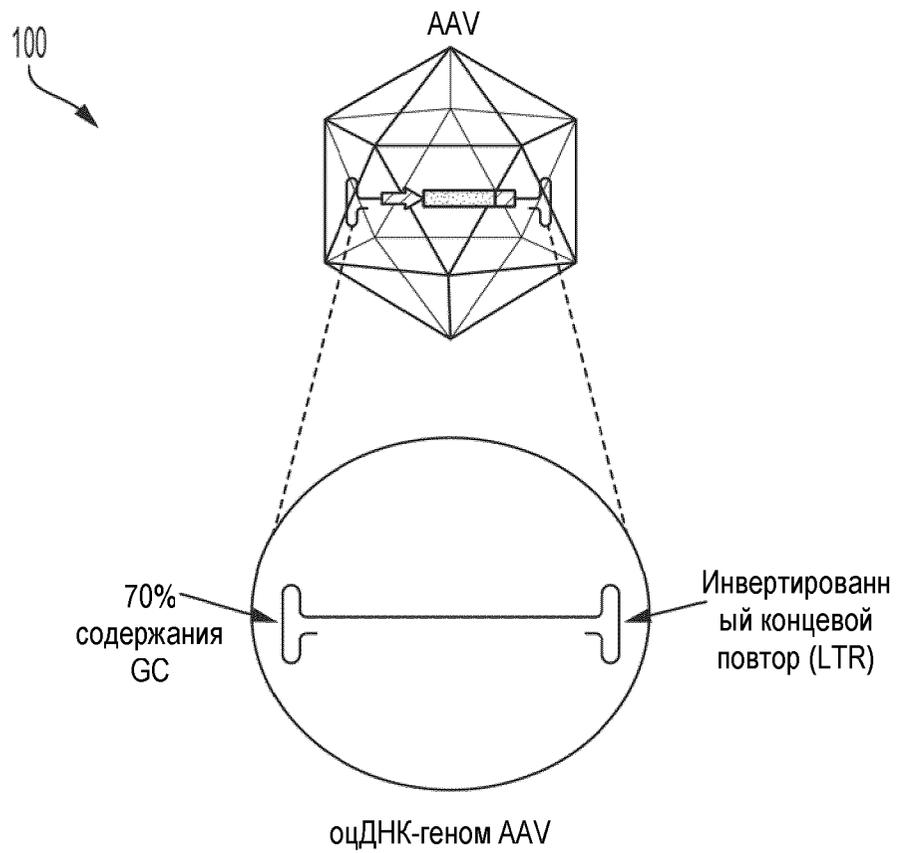
27. Способ по любому из пп. 1-26, где секвенирование идентифицирует от приблизительно 100 до приблизительно 5000 нуклеотидов в секвенированной цепи.

28. Способ по п. 27, где секвенирование идентифицирует от 100 до 1000 нуклеотидов в секвенированной цепи.

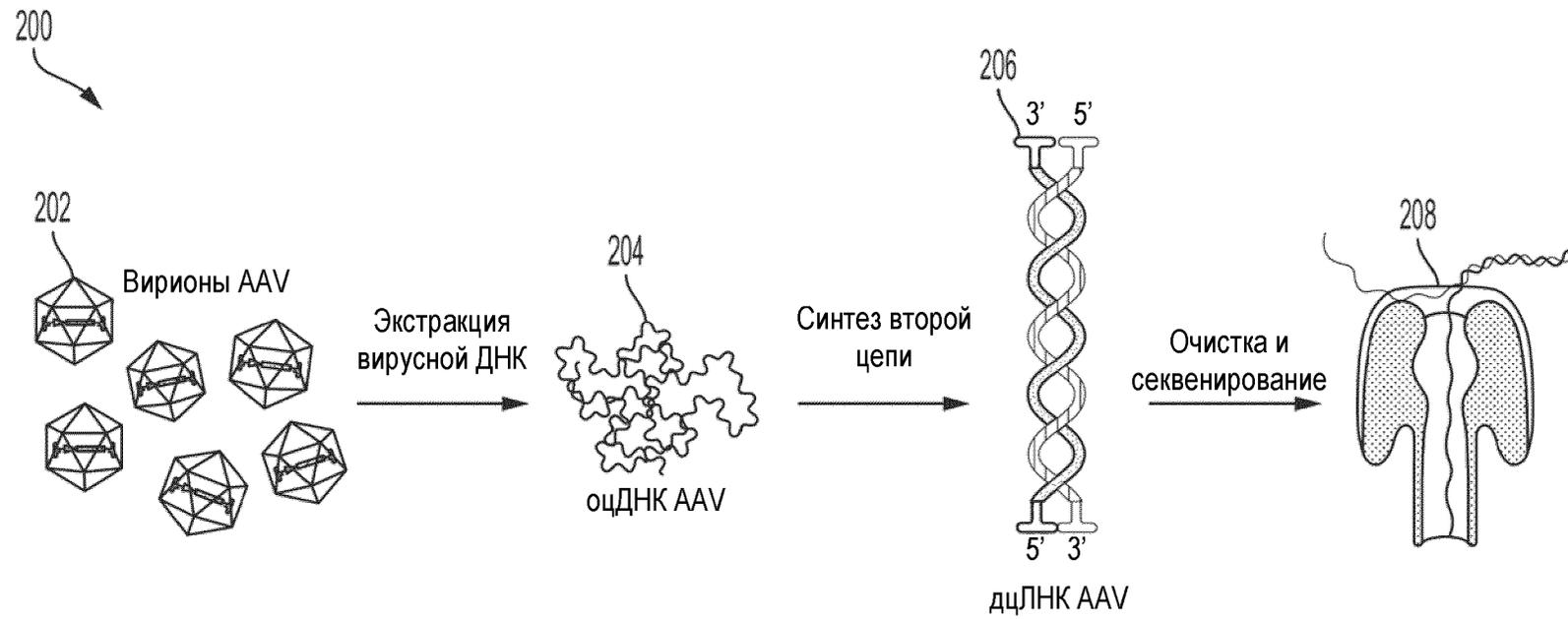
29. Способ по п. 28, где секвенирование идентифицирует от 100 до 500 нуклеотидов в секвенированной цепи.

30. Способ по любому из пп. 1-29, где секвенирование выполняют без фрагментации секвенированной цепи.

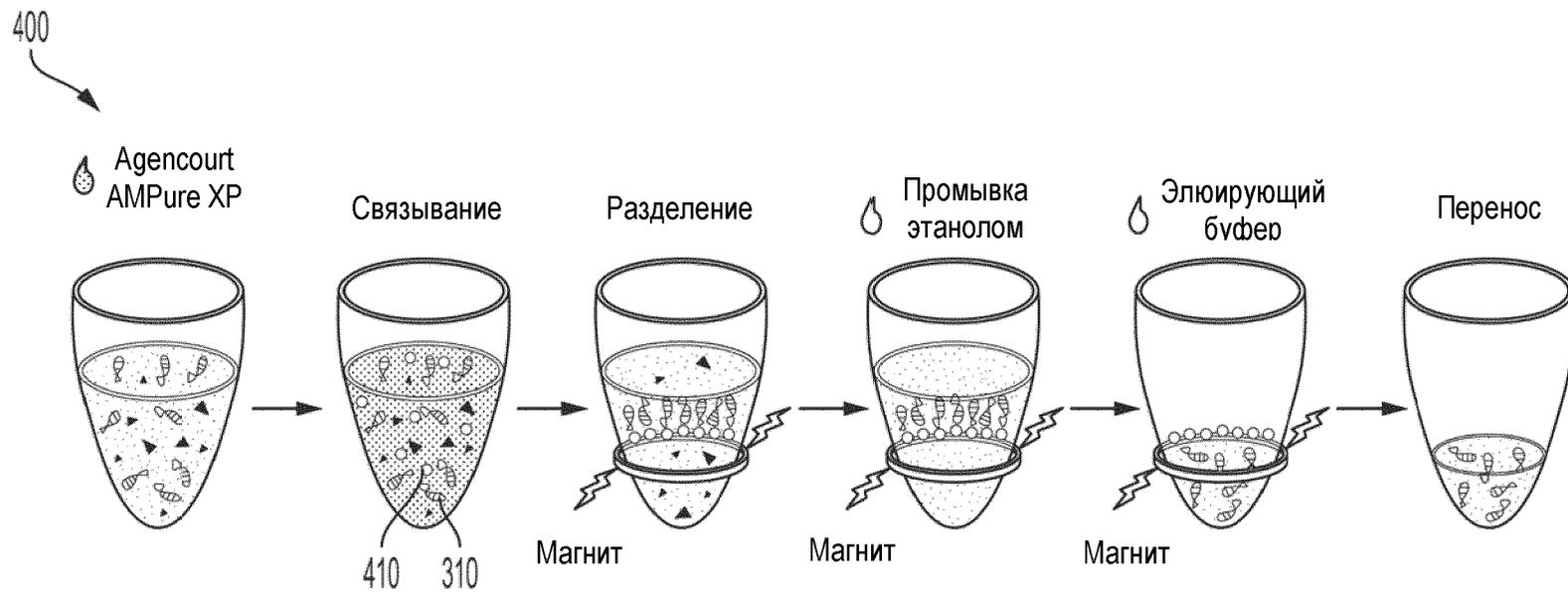
По доверенности



ФИГ. 1

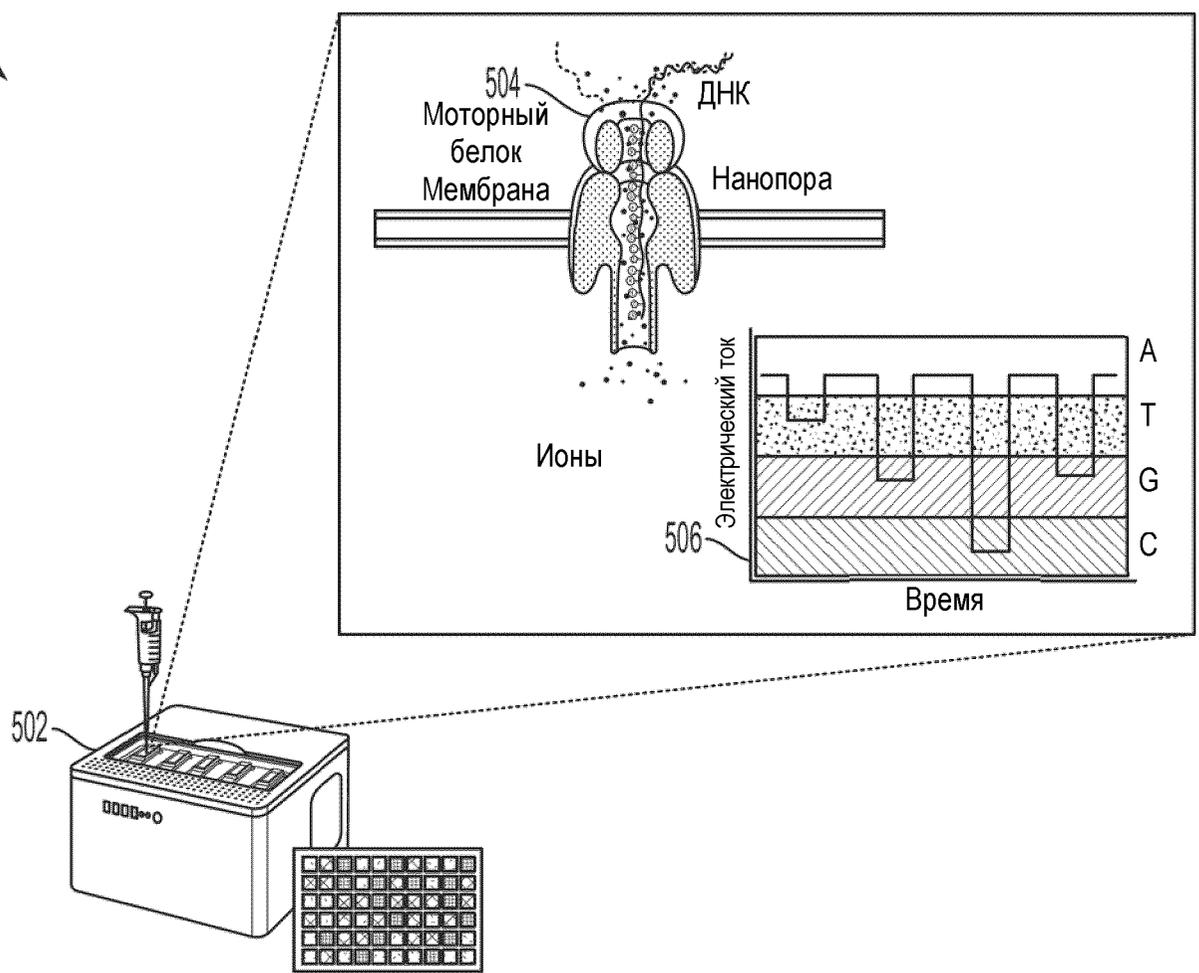


ФИГ. 2

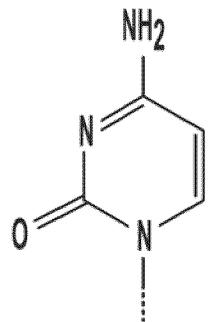


ФИГ. 4

500

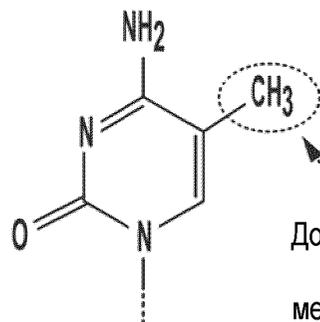


ФИГ. 5



Цитозин

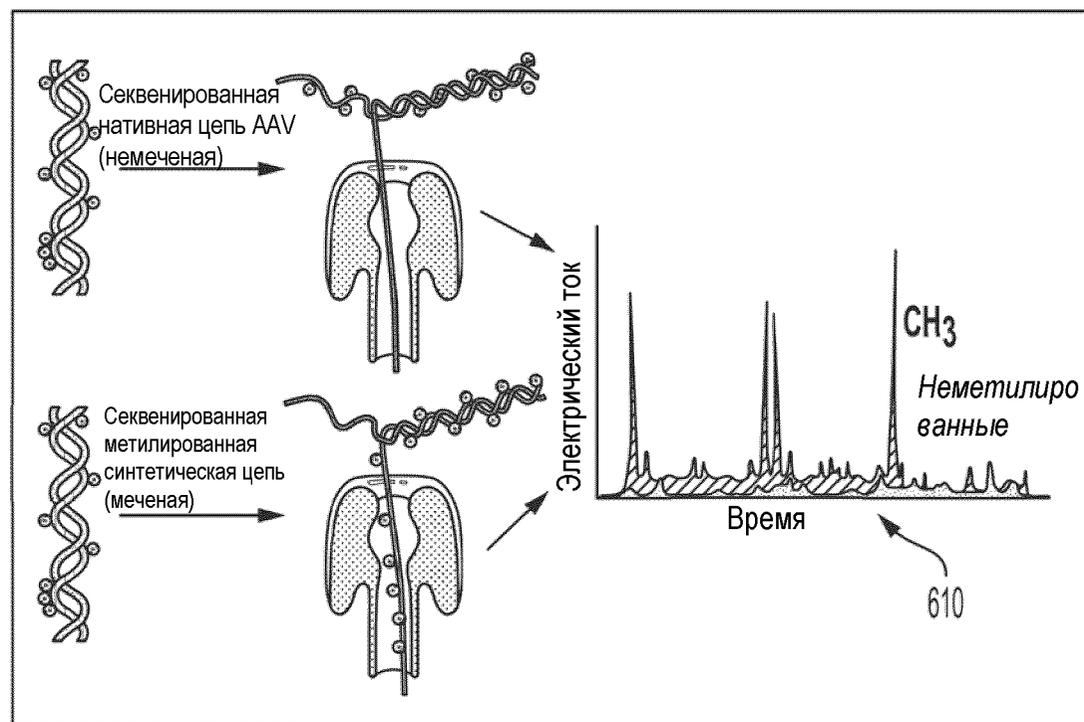
ФИГ. 6А



Дополнительная метильная группа

5-метилцитозин

ФИГ. 6В



ФИГ. 6С