



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3488007 B1

NORWAY

(19) NO

(51) Int Cl.

C12N 15/861 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C07K 2/00 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 15/64 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2024.04.08
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2023.12.20
(86)	European Application Nr.	17831956.2
(86)	European Filing Date	2017.07.21
(87)	The European Application's Publication Date	2019.05.29
(30)	Priority	2016.07.21, US, 201662365312 P
(84)	Designated Contracting States:	AL; AT; BE; BG; CH; CY; CZ; DE; DK; EE; ES; FI; FR; GB; GR; HR; HU; IE; IS; IT; LI; LT; LU; LV; MC; MK; MT; NL; NO; PL; PT; RO; RS; SE; SI; SK; SM; TR
(73)	Proprietor	Spark Therapeutics, Inc., 3737 Market Street Suite 1300, Philadelphia, Pennsylvania 19104, USA
(72)	Inventor	QU, Guang, 22 Beaver Dam Drive, Sicklerville New Jersey 08081, USA WRIGHT, John Fraser, 305 Lacour Way, Redwood City California 94061, USA OH, Younghoon, 766 Robinhood Road, Bryn Mawr Pennsylvania 19010, USA WANG, Yuhuan, 10 Arianas Court, Mount Laurel New Jersey 08054, USA ZHANG, Haibo, 30 President Avenue, Rutledge Pennsylvania 19070, USA DUNCAN, Laura, 7 Greenlawn Road,, Paoli, Pennsylvania 19301, USA
(74)	Agent or Attorney	ZACCO NORWAY AS, Postboks 488, 0213 OSLO, Norge

(54) Title **SCALABLE HIGH RECOVERY METHODS FOR PRODUCING HIGH YIELD RECOMBINANT
ADENO-ASSOCIATED VIRAL (RAAV) VECTOR AND RECOMBINANT ADENO-
ASSOCIATED VIRAL (RAAV) VECTORS PRODUCED THEREBY**

(56) References
Cited: WO-A1-2005/118792, WO-A1-2011/094198, WO-A1-2016/128408, WO-A2-2006/087643,
US-A1- 2011 165 645, US-A1- 2013 072 548, US-A1- 2016 024 139, US-A1- 2015 275 186,
WRIGHT J FRASER ET AL: "Recombinant adeno-associated virus: formulation challenges and
strategies for a gene therapy vector", CURRENT OPINION IN DRUG DISCOVERY AND
DEVELOPMENT, CURRENT DRUGS, LONDON, GB, vol. 6, no. 2, 1 March 2003 (2003-03-01),
pages 174-178, XP009092903, ISSN: 1367-6733
J. WRIGHT: "Product-Related Impurities in Clinical-Grade Recombinant AAV Vectors:
Characterization and Risk Assessment", BIOMEDICINES, vol. 2, no. 1, 3 March 2014 (2014-03-
03), pages 80-97, XP055533563, DOI: 10.3390/biomedicines2010080
GRZENIA D L ET AL: "Tangential flow filtration for virus purification", JOURNAL OF
MEMBRANE SCIENCE, ELSEVIER BV, NL, vol. 321, no. 2, 15 August 2008 (2008-08-15),
pages 373-380, XP022820479, ISSN: 0376-7388, DOI: 10.1016/J.MEMSCI.2008.05.020
[retrieved on 2008-05-21]

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

Patentkrav

1. Fremgangsmåte for fremstilling av rekombinante adenoassosiert virus-(rAAV)-vektorpartikler med høy gjenvinning eller høyt titer, hvor fremgangsmåten omfatter de trinn å:

- 5 (a) høste celler og/eller cellekultur-supernatant omfattende rAAV-vektorpartikler;
(b) eventuelt konsentrere cellene og/eller cellekultur-supernatanten høstet i trinn (a), eventuelt via tangential strømningsfiltrering, for å frembringe et konsentrert høsteprodukt;
(c) lysere høsteproduktet frembragt i trinn (a) eller det konsentrerte høsteproduktet frembragt i trinn (b), eventuelt gjennom mikrofluidisering, for å frembringe et lysat;
- 10 (d) filtrere lysatet frembragt i trinn (c) for å frembringe et klart lysat;
(e) utsette det klare lysatet frembragt i trinn (d) for ionebytter-kolonnekromatografi for å frembringe et kolonne-eluat omfattende rensede rAAV-vektorpartikler, og eventuelt konsentrere kolonne-eluatet gjennom tangential strømningsfiltrering for å frembringe et konsentrert kolonne-eluat;
- 15 (f) blande kolonne-eluatet eller det konsentrerte kolonne-eluatet frembragt i trinn (e) med cesiumklorid for å frembringe en blanding, og utsette blandingen for gradient-ultrasentrifugering for i det vesentlige å skille *bona fide*-rAAV-vektorpartikler fra tomme kapsid-AAV-partikler og andre AAV-vektor-beslektede urenheter;
(g)(1) samle opp *bona fide*-rAAV-vektorpartiklene utskilt i trinn (f) og
- 20 (g)(2) formulere de oppsamlede *bona fide*-rAAV-vektorpartiklene i en buffer med et ikke-ionisk overflateaktivt stoff;
(h) utsette *bona fide*-rAAV-vektorpartiklene i trinn (g)(2) for et bufferbytte gjennom tangential strømningsfiltrering for å frembringe en AAV-vektorformulering; og
(i) filtrere AAV-vektorformuleringen frembragt i trinn (h) og derigjennom frembringe en
- 25 formulering av *bona fide*-rAAV-vektorpartikler med høy gjenvinning eller høyt titer.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor bufferen i trinn (g)(2) omfatter
(1) natriumklorid, og/eller natriumfosfat; eller
(2) natriumklorid fra en konsentrasjon på omtrent 5mM til en konsentrasjon på omtrent 500
- 30 mM.
3. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor det ikke-ioniske overflateaktive stoffet i trinn (g)(2)
(1) omfatter en polyalkylenglykol;

(2) omfatter en blokk-kopolymer omfattende minst én polyetylenglykolblokk og minst én polypropylenglykolblokk;

(3) omfatter et alkylpolyglykosid, cetostearylalkohol, cetylalkohol, kokamid-DEA, kokamid-MEA, dekyglukosid, etoksylat, IGEPAL CA-630, Isoceteth-20, glukosider, maltosider, monolaurin, nonidet-P-40, nonoksynoler så som nonoksynol-9, NP-40, oktaetylenglykol-monododekyleter, N-oktyl-beta-D-tioglukopyranosider, oktylglukosider, oleylalkohol, PEG-10-solsikkeglyserider, pentaetylenglykol-monododekyleter, poloksamerer så som poloksamer 407, poloksamer 188 (poly(etylenoksid-ko-polypropylenoksid)), polyglyserol-polyricinoleat, sorbitaner, stearylalkohol, Triton X-100 eller Tween 80;

(4) omfatter cetomakrogol 1000, polysorbater så som polysorbat 20 (polyoksyetylen (20)-sorbitanmonolaurat), polysorbat 40 (polyoksyetylen (20)-sorbitan-monopalmitat), polysorbat 60 (polyoksyetylen (20)-sorbitan-monostearat), polysorbat 80 (polyoksyetylen (20)-sorbitan-monooleat); polyglyserol-polyricinoleat, oktadekansyre [2-[(2R,3S,4R)-3,4-dihydroksy-2-tetrahydrofuranyl]-2-hydroksyetyl]-ester, oktadekansyre [(2R,3S,4R)-2-[1,2-bis(1-oksooktadekoksy)etyl]-4-hydroksy-3-tetrahydrofuranyl]-ester; langkjedede C8- til C22-alkoholer så som 1-oktadekanol, cetylstearyl-alkohol, Heksadekan-1-ol og cis-9-oktadeken-1-ol; substituert eller usubstituert oktylfenol der substituentene kan inkludere en polyetoksyetanolgruppe (f.eks. for å danne oktylfenoksyetanol) eller en hvilken som helst annen substituent som vil danne et ikke-ionisk overflateaktivt stoff med oktylfenol; polyetylenglykol-monoisohexadekyleter; dodekansyre 2,3-dihydroksypropyl-ester; glukosider, som kan inkludere laurylglukosid, oktylglukosid og dekyglukosid; fettsyreamider så som kokamid-dietanolamin og kokamid-monoetanolamin; eller ikke-ioniske overflateaktive stoffet som har en hydrofil polyetylenoksidkjede og en lipofil eller hydrofil aromatisk hydrokarbongruppe, så som Nonoksynol-9 og Triton X-100;

(5) omfatter en polyetylenglykol-blokk-polypropylenglykol-blokk-polyetylenglykol eller en triblokk-kopolymer sammensatt av en sentral hydrofob kjede av polyoksypropylen (polypropylenoksid)) flankert av to hydrofile kjeder av polyoksyetylen (poly(etylenoksid)); eller

(6) har en konsentrasjon på omtrent 0,0001 % til en konsentrasjon på omtrent 0,1%.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor

(1) *bona fide*-rAAV-vektorpartiklene foreligger i formuleringen som frembringes i trinn (i) i en konsentrasjon på omtrent 10^{15} partikler per mL til omtrent en konsentrasjon på 10^{18} *bona fide*-rAAV-vektorpartikler per mL;

(2) utbyttet av *bona fide* rAAV-vektorpartiklene i trinn (i) er minst omtrent 5×10^{12} *bona fide*-rAAV-vektorpartikler/ml; eller

(3) gjenvinningen av *bona fide*-rAAV-vektorpartiklene i trinn (i) er minst omtrent 60% av de totale rAAV-vektorpartiklene i trinn (a).

5

5. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor *bona fide*-rAAV-vektorpartiklene avledes fra en AAV valgt fra gruppen bestående av AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 og Rh74.

10 6. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor

(1) *bona fide*-rAAV-partiklene omfatter et transgen som koder for en hemmende nukleinsyre;

(2) *bona fide*-rAAV-partiklene omfatter et transgen som koder for et genprodukt valgt fra gruppen bestående av insulin, glukagon, veksthormon (GH), paratyroidhormon (PTH), veksthormonfrigjørende faktor (GRF), follikkelstimulerende hormon (FSH), luteiniserende hormon (LH), human korionisk gonadotropin (hCG), vaskulær endotelial vekstfaktor (VEGF), angiopoietiner, angiostatin, granulocyttkoloni-stimulerende faktor (GCSF), erythropoietin (EPO), bindevev-vekstfaktor (CTGF), basisk fibroblast-vekstfaktor (bFGF), sur fibroblast-vekstfaktor (aFGF), epidermal vekstfaktor (EGF), transformerende vekstfaktor α (TGF α), blodplateavledet vekstfaktor (PDGF), insulinvekstfaktorer I og II (IGF-I og IGF-II), TGF β , aktiviner, inhibiner, beinmorfogent protein (BMP), nerve-vekstfaktor (NGF), hjerneavledet nevrotrop faktor (BDNF), nevrotrofiner NT-3 og NT4/5, ciliær nevrotrop faktor (CNTF), glialcellelinje-avledet nevrotrop faktor (GDNF), neurturin, agrin, netrin-1 og netrin-2, hepatocyt-vekstfaktor (HGF), efriner, noggin, sonisk pinnsvin og tyrosinhydroksylase;

(3) *bona fide* rAAV-partiklene omfatter et transgen som koder for et genprodukt valgt fra gruppen bestående av trombopoietin (TPO), interleukiner (IL1 til IL-17), monocyt-kjemoattraktant protein, leukemihemmende faktor, granulocyt-makrofagkoloni-stimulerende faktor, Fas-ligand, tumornekrosefaktorer α og β , interferoner α , β og γ , stamcellefaktor, flk-2/flt3-ligand, IgG, IgM, IgA, IgD og IgE, kimære immunoglobuliner, humaniserte antistoffer, enkeltkjedede antistoffer, T-cellereseptorer, kimære T-cellereseptorer, enkeltkjedede T-cellereseptorer, MHC-molekyler av klasse I og klasse II;

(4) *bona fide*-rAAV-vektorpartiklene omfatter et transgen som koder for et protein nyttig for korreksjon av medfødte feil i metabolismen valgt fra gruppen bestående av karbamoyl-syntetase I, ornitin-transkarbamylase, arginosuccinat-syntetase, arginosuksinat-lyase, arginase, fumarylacetacetat-hydrolase, fenylalanin-hydroksylase, alfa-1-antitrypsin, glukose-

6-fosfatase, porfobilinogen-deaminase, faktor V, faktor VIII, faktor IX, cystation beta-syntase, forgrenet kjede ketosyre-dekarboksylase, albumin, isovaleryl-CoA-dehydrogenase, propionyl-CoA-karboksylase, metylmalonyl-CoA-mutase, glutaryl-CoA-dehydrogenase, insulin, beta-glukosidase, pyruvat-karboksylat, hepatisk fosforylase, fosforylasekinase, glycin-dekarboksylase, RPE65, H-protein, T-protein, en cystisk fibrose transmembranregulator- (CFTR)-sekvens, og en dystrofin cDNA-sekvens;

(5) *bona fide* rAAV-vektorpartiklene omfatter et transgen som koder for et protein nyttig for korreksjon av nevrodegenerative sykdommer; eller

(6) proteinet er tripeptidyl-peptidase 1 (TPP1).

10

7. Fremgangsmåte ifølge krav 6, del (1), hvor den hemmende nukleinsyren er valgt fra gruppen bestående av siRNA, et antisensmolekyl, miRNA, ribozym og shRNA.

15

8. Fremgangsmåte ifølge krav 1, omfattende å samle opp de tomme kapsidpartiklene separat i trinn (f).

9. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor renhet av *bona fide*-rAAV-vektorpartiklene i filtratet i trinn (i) er minst omtrent 80%.

20

10. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor de tomme kapsidpartiklene foreligger i filtratet i trinn (i) i en mengde på 10% eller mindre.

11. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor filtratet i trinn (i) ikke har mer enn omtrent 10% aggregerte rAAV-partikler.

25

12. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor sentrifugeringen i trinn (f) (1) utføres i ett enkelt trinn; eller (2) er tetthetsgradient-ultrasentrifugering.

30

13. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor kolonne-eluatet i trinn (e) konsentreres gjennom tangential strømningsfiltrering for å frembringe et konsentrert kolonne-eluat.

14. Fremgangsmåte ifølge krav 1, videre omfattende å tilsette en nuklease til lyseatet som frembringes i trinn (c).
15. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 1-14, hvor fremgangsmåten frembringer rAAV-vektorpartikler med et høyere titer enn rAAV-vektorpartikler som er frembragt der et ikke-ionisk overflateaktivt stoff tilsettes til AAV-vektorformuleringen etter bufferbytte gjennom tangential strømningsfiltrering i trinn (h).
16. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 1-14, hvor de oppsamlede *bona fide*-rAAV-vektorpartiklene i trinn (g)(1) fortynnes til en konsentrasjon på mindre enn omtrent 5×10^{12} rAAV-vektorpartikler/ml, før, i det vesentlige samtidig med eller etter trinn (g)(2).
17. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 1-14, hvor den tangentielle strømningsfiltreringen i trinn (b), (e) og/eller (h) utføres
- (1) ved et transmembrantrykk på mellom omtrent 2-15 psig; eller
- (2) ved en skjærrate større enn omtrent 3000 s^{-1} .