



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3497207 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 7/00 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2021.06.14
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2021.01.06
(86)	European Application Nr.	17761362.7
(86)	European Filing Date	2017.08.14
(87)	The European Application's Publication Date	2019.06.19
(30)	Priority	2016.08.15, US, 201662375314 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
	Designated Extension States:	BA ; ME
	Designated Validation States:	MA ; MD
(73)	Proprietor	Genzyme Corporation, 50 Binney Street, Cambridge, MA 02142, USA
(72)	Inventor	JIN, Xiaoying, c/o Sanofi 55 Corporate Drive, Bridgewater, NJ 08807, USA O'RIORDAN, Catherine, R., c/o Sanofi 55 Corporate Drive, Bridgewater, NJ 08807, USA LIU, Lin, c/o Sanofi 55 Corporate Drive, Bridgewater, NJ 08807, USA ZHANG, Kate, c/o Sanofi 55 Corporate Drive, Bridgewater, NJ 08807, USA
(74)	Agent or Attorney	TANDBERG INNOVATION AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Title	METHODS FOR DETECTING AAV
(56)	References Cited:	WO-A1-2013/158879 NAGHMEH AHMADIANKIA ET AL: "Generation of Helper Plasmids Encoding Mutant Adeno- associated Virus Type 2 Capsid Proteins with Increased Resistance against Proteasomal Degradation", IRAN J BASIC MED SCI, vol. 16, 1 July 2013 (2013-07-01), pages 813-821, XP055416936, S. MURRAY ET AL: "Characterization of the Capsid Protein Glycosylation of Adeno-Associated Virus Type 2 by High-Resolution Mass Spectrometry", JOURNAL OF VIROLOGY., vol. 80, no. 12, 26 May 2006 (2006-05-26), pages 6171-6176, XP055284117, US ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.02417-05 cited in the application VAN VLIET K ET AL: "Adeno-associated virus capsid serotype identification: Analytical methods

development and application", JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, ELSEVIER BV, NL, vol. 159, no. 2, 1 August 2009 (2009-08-01), pages 167-177, XP026159973, ISSN: 0166-0934, DOI: 10.1016/J.JVIROMET.2009.03.020 [retrieved on 2009-03-26] cited in the application

STEVEN J. BARK ET AL: "High-Temperature Protein Mass Mapping Using a Thermophilic Protease", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 123, no. 8, 1 February 2001 (2001-02-01), pages 1774-1775, XP055417355, US ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/ja002909n

JOANNA A. MAJCHRZYKIEWICZ-KOEHORST ET AL: "Rapid and generic identification of influenza A and other respiratory viruses with mass spectrometry", JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, vol. 213, 1 March 2015 (2015-03-01), pages 75-83, XP055416366, NL ISSN: 0166-0934, DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.11.014

XIAOYING JIN ET AL: "Direct Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis for Complete Characterization of Recombinant Adeno-Associated Virus Capsid Proteins", HUMAN GENE THERAPY METHODS, 16 June 2017 (2017-06-16), XP055416361, ISSN: 1946-6536, DOI: 10.1089/hgtb.2016.178

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

5

1. En fremgangsmåte for å bestemme serotypen av en adeno-assosiert virus (AAV) partikkel som omfatter

a) å denaturere AAV-partikkelen,

b) å underkaste den denaturerte AAV-partikkelen for væskekromatografi/-
massespektrometri (LC/MS), og

10

c) å bestemme massene av VP1, VP2 og VP3 av AAV-partikkelen;

hvor den spesifikke kombinasjonen av masser av VP1, VP2 og VP3 er indikativ for AAV-serotypen,

eventuelt hvor de beregnede massene av VP1, VP2 og VP3 blir sammenlignet med de
teoretiske massene av VP1, VP2 og VP3 i én eller flere AAV serotyper.

15

2. En fremgangsmåte for å bestemme heterogeniteten av en AAV-partikkel som omfatter

a) å denaturere AAV-partikkelen,

b) å underkaste den denaturerte AAV-partikkelen for væskekromatografi/-
massespektrometri/massespektrometri (LC/MS/MS),

20

c) å bestemme massene av VP1, VP2 og VP3 av AAV-partikkelen, og

d) å sammenligne massene i trinn c) med de teoretiske massene av VP1, VP2 og
VP3 av AAV-serotypen;

25

hvor et avvik i én eller flere av massene av VP1, VP2 eller VP3 er indikativ for AAV-kapsid-heterogeniteten,

eventuelt hvor heterogeniteten omfatter én eller flere av blandede serotyper, variant kapsider, kapsid aminosyresubstitusjoner, trunkerte kapsider, eller modifiserte kapsider.

30

3. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1-2, hvor AAV-partikkelen er denaturert med eddiksyre, guanidinhydroklorid og/eller et organisk løsemiddel.

4. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1-3, hvor væskekromatografien er reversfase-væskekromatografi, størrelseseksklusjonskromatografi, hydrofil interaksjon-væskekromatografi, eller kationbytter-kromatografi.

35

5. Fremgangsmåten ifølge krav 4, hvor den reversfase-kromatografien er en C4 eller C8 revers-kromatografi.

6. Fremgangsmåten ifølge krav 5, hvor kromatografien bruket en mobil fase A som omfatter maursyre i vann, eventuelt hvor den mobile fase A omfatter rundt 0.1 % maursyre.

7. Fremgangsmåten ifølge krav 5 eller krav 6, hvor kromatografien omfatter a mobil fase B som omfatter maursyre i acetonitril, eventuelt hvor den mobile fase B omfatter rundt 0.1% maursyre.

8. Fremgangsmåten ifølge krav 7, hvor andelen av mobil fase B i kromatografien øker over tid, eventuelt hvor andelen av mobil fase B i kromatografien øker i en trinnvis måte og hvor mobil fase B øker fra rundt 10 % til rundt 20 %, fra rundt 20 % til rundt 30 %, og fra rundt 30 % til rundt 38 %, eventuelt hvor mobil fase B øker fra rundt 10 % til rundt 20 % på rundt 6 minutter, fra rundt 20 % til rundt 30 % på rundt 10 minutter, og fra rundt 30 % til rundt 38 % på rundt 40 minutter.

9. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1-8, hvor væskekromatografien er ultra-ytelses væskekromatografi (UPLC).

10. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1-9, hvor masse-spektrometrien omfatter:

- (i) en kapillærspenning på rundt 3.5 kV;
- (ii) en prøvetakingskeglespenning på rundt 45 V; og/eller
- (iii) assistert kalibrering, eventuelt hvor natriumjodid blir brukt som kalibreringsmiddel.

11. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1-10, hvor N-terminusen av VP1 og/eller VP3 er acetylert.

12. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1-11, hvor AAV-partikkelen:

- (i) er en rekombinant AAV- partikkel (rAAV); og/eller
- (ii) omfatter et AAV1 kapsid, et AAV2 kapsid, et AAV3 kapsid, et AAV4 kapsid, et AAV5 kapsid, et AAV6 kapsid, et AAV7 kapsid, et AAV8 kapsid, et AAVrh8 kapsid,

et AAV9 kapsid, et AAV10 kapsid, et AAVrh10 kapsid, et AAV11 kapsid, et AAV12 kapsid, et AAV LK03 kapsid, et AAV2R471A kapsid, et AAV2/2-7m8 kapsid, et AAV DJ kapsid, et AAV DJ8 kapsid, et AAV2 N587A kapsid, et AAV2 E548A kapsid, et AAV2 N708A kapsid, et AAV V708K kapsid, et geit-AAV kapsid, et AAV1/AAV2 kimært kapsid, et bovint-AAV kapsid, et muse-AAV kapsid rAAV2/HBoV1 (kimært AAV /humant bocavirus virus 1), et AAV2HBKO kapsid, et AAVPHP.B kapsid eller et AAVPHP.eB kapsid,

eventuelt hvor AAV kapsidet omfatter en tyrosinmutasjon eller en heparinbindende mutasjon.

13. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1-12, hvor:

(i) massene av VP1, VP2, og VP3 blir sammenlignet med de teoretiske massene i én eller flere av AAV1 kapsid, et AAV2 kapsid, et AAV3 kapsid, et AAV4 kapsid, et AAV5 kapsid, et AAV6 kapsid, et AAV7 kapsid, et AAV8 kapsid, et AAVrh8 kapsid, et AAV9 kapsid, et AAV10 kapsid, et AAVrh10 kapsid, et AAV11 kapsid, et AAV12 kapsid, et AAV LK03 kapsid, et AAV2R471A kapsid, et AAV2/2-7m8 kapsid, et AAV DJ kapsid, et AAV DJ8 kapsid, et AAV2 N587A kapsid, et AAV2 E548A kapsid, et AAV2 N708A kapsid, et AAV V708K kapsid, et geit-AAV kapsid, et AAV1/AAV2 kimært kapsid, et bovint-AAV kapsid, et muse-AAV kapsid rAAV2/HBoV1 (kimært AAV/humant bocavirus virus 1), et AAV2HBKO kapsid, et AAVPHP.B kapsid eller et AAVPHP.eB kapsid; og/eller

(ii) virus partikkelen omfatter et AAV1 ITR, et AAV2 ITR, et AAV3 ITR, et AAV4 ITR, et AAV5 ITR, et AAV6 ITR, et AAV7 ITR, et AAV8 ITR, et AAVrh8 ITR, et AAV9 ITR, et AAV 10 ITR, et AAVrh10 ITR, et AAV11 ITR, eller et AAV12 ITR.

14. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1-13, hvor AAV-partikkelen omfatter en AAV-vektor som koder for et heterologt transgen.

15. En fremgangsmåte for å bestemme serotypen av en AAV-partikkel som omfatter fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1, eller 3-14 kombinert med en ytterligere fremgangsmåte for å bestemme serotypen av en adeno-assosiert virus (AAV) partikkel som omfatter:

- a) å denaturere AAV-partikkelen,
- b) å underkaste den denaturerte AAV-partikkelen for reduksjon og/eller alkylering,
- c) å underkaste den denaturerte AAV-partikkelen for fordøyelse for å generere fragmenter av VP1, VP2 og/eller VP3 av AAV-partikkelen,

d) å underkaste fragmentene av VP1, VP2 og/eller VP3 for
væskekromatografi/massespektrometri-massespektrometri (LC/MS/MS), og

e) å bestemme massene av fragmenter av VP1, VP2 og VP3 av AAV-partikkelen;

hvor den spesifikke kombinasjonen av masser av fragmenter av VP1, VP2 og VP3 er

5 indikativ for AAV-serotypen.

16. En fremgangsmåte for å bestemme heterogenitet av en AAV-partikkel som omfatter
fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 2-14 kombinert med en
ytterligere fremgangsmåte for å bestemme heterogeniteten av en serotype av en AAV-
10 partikkel som omfatter:

a) å denaturere AAV-partikkelen,

b) å underkaste den denaturerte AAV-partikkelen for reduksjon og/eller alkylering,

c) å underkaste den denaturerte AAV-partikkelen for fordøyelse for å generere
fragmenter av VP1, VP2 og/eller VP3 av AAV-partikkelen,

15 d) å underkaste fragmentene av VP1, VP2 og/eller VP3 for
væskekromatografi/massespektrometri-massespektrometri (LC/MS/MS),

e) å bestemme massene av fragmenter av VP1, VP2 og VP3 av AAV-partikkelen,
og

f) å sammenligne massene i trinn e) med de teoretiske massene av fragmenter av
20 VP1, VP2 og VP3 av AAV-serotypen;

hvor et avvik i én eller flere av massene av VP1, VP2 or VP3 er indikativ for AAV-kapsid-
heterogeniteten.