



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3953483 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.

C12N 15/86 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2023.12.18
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2023.10.04
(86)	European Application Nr.	20722925.3
(86)	European Filing Date	2020.04.10
(87)	The European Application's Publication Date	2022.02.16
(30)	Priority	2019.04.11, US, 201962832364 P 2019.04.26, US, 201962839182 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	REGENXBIO Inc., 9804 Medical Center Drive, Rockville, MD 20850, USA
(72)	Inventor	ZHI, Li, c/o Regenxbio Inc. 9804 Medical Center Drive, Rockville, MD 20850, USA WU, Zhuchun, c/o Regenxbio Inc. 9804 Medical Center Drive, Rockville, MD 20850, USA
(74)	Agent or Attorney	RWS, Europa House, Chiltern Park, Chiltern Hill, SL99FG CHALFONT ST PETER, Storbritannia

(54)	Title	METHODS OF SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY FOR THE CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT ADENO-ASSOCIATED VIRUS COMPOSITIONS
(56)	References Cited:	WO-A1-2019/212922 WO-A1-2008/109721 ZHI LI ET AL: "Assessing Purity and Structures of AAV Vector Genomes by High Performance Size Exclusion Chromatography", MOLECULAR THERAPY : THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY; 22ND ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-GENE-AND-CELL-THERAPY (ASGCT); WASHINGTON, DC, USA; APRIL 29 - MAY 02, 2019, CELL , vol. 27, no. 4, Suppl. 1 22 April 2019 (2019-04-22), page 92, XP009521558, ISSN: 1525-0016 Retrieved from the Internet: URL: https://www.sciencedirect.com/journal/molecular-therapy/vol/27/issue/4/suppl/S1 Herb Runnels ET AL: "Gene Therapy and AAV: Advancing Analytical Characterization to Improve Product Understanding, Control and Comparability Exercises CMC Strategy Forum 17 July 2017", , 17 June 2017 (2017-06-17), XP055713999, Retrieved from the Internet: URL: https://cdn.ymaws.com/www.casss.org/re_source/resmgr/cmc_no_am_jul_spkr_slds/2017_CMCS_RunnelsHerb.pdf [retrieved on 2020-07-13] WEIHONG QU ET AL: "Scalable Downstream Strategies for Purification of Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors in Light of the Properties", CURRENT PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY, vol. 16, 1 January 2015 (2015-01-01), pages 684-695, XP055533837, NL ISSN: 1389-2010, DOI: 10.2174/1389201016666150505122228 ERIC LARGY ET AL: "Shape matters: size-exclusion HPLC for the study of nucleic acid structural polymorphism", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 42, no. 19, 20 August 2014 (2014-08-20), pages e149-e149, XP055714147, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gku751

MARIA SCHNÖDT ET AL: "Improving the Quality of Adeno-Associated Viral Vector Preparations: The Challenge of Product-Related Impurities", HUMAN GENE THERAPY METHODS, vol. 28, no. 3, 1 June 2017 (2017-06-01), pages 101-108, XP055713449, ISSN: 1946-6536, DOI: 10.1089/hgtb.2016.188

SOMMER J M ET AL: "Quantification of adeno-associated virus particles and empty capsids by optical density measurement", MOLECULAR THERAPY : THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY, CELL PRESS, US, vol. 7, no. 1, 1 January 2003 (2003-01-01) , pages 122-128, XP002965707, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1016/S1525-0016(02)00019-9

GRIEGER JOSHUA C ET AL: "Production and characterization of adeno-associated viral vectors", NATURE PROTOCOLS, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 1, no. 3, 1 January 2006 (2006-01-01) , pages 1412-1428, XP001525224, ISSN: 1750-2799

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 å isolere rekombinant adenoassosiert virus-(rAAV)-genom omfattende
- 5 a) å utsette en sammensetning omfattende rAAV-partikler for en tilstand der rAAV-partiklene denatureres; og
- b) å utsette sammensetningen omfattende de denaturerte rAAV-partiklene for størrelseseksklusjonskromatografi,
- 10 hvori den mobile fasen for størrelseseksklusjonskromatografien omfatter et salt, organisk løsningsmiddel eller detergent.
2. Fremgangsmåten ifølge krav 1, videre omfattende å utvinne AAV-genomet; eller å måle eluatets UV-absorbans ved én eller begge av ca. 260 nm og ved ca. 280 nm.
- 15 3. Fremgangsmåte for å bestemme vektorgenomstørrelsesrenheten til en sammensetning omfattende isolerte rAAV-partikler, hvori fremgangsmåten omfatter
- a) å utsette sammensetningen for en tilstand der rAAV-partiklene denatureres;
- b) å utsette sammensetningen omfattende de denaturerte rAAV-partiklene for størrelseseksklusjonskromatografi;
- 20 c) å måle eluatets UV-absorbans ved én eller begge av ca. 260 nm og ved ca. 280 nm; og
- d) å bestemme vektorgenomstørrelsen til sammensetningen omfattende rAAV-partikler, hvori den mobile fasen for størrelseseksklusjonskromatografien omfatter et salt, organisk løsningsmiddel eller detergent.
- 25 4. Fremgangsmåte for å vurdere foldingen eller den sekundære strukturen av AAV-vektorgenomer inne i kapsidene, hvori fremgangsmåten omfatter
- a) å utsette sammensetningen for en tilstand der rAAV-partiklene denatureres;
- b) å utsette sammensetningen omfattende de denaturerte rAAV-partiklene for størrelseseksklusjonskromatografi; og
- 30 c) å måle eluatets UV-absorbans ved én eller begge av ca. 260 nm og av ca. 280 nm, hvori den mobile fasen for størrelseseksklusjonskromatografien omfatter et salt, organisk løsningsmiddel eller detergent.
5. Fremgangsmåte for å bestemme vektorgenomtiter (Vg) til en sammensetning
- 35 omfattende isolerte rAAV-partikler, hvori fremgangsmåten omfatter
- a) å utsette sammensetningen for en tilstand der rAAV-partiklene denatureres;
- b) å utsette sammensetningen omfattende de denaturerte rAAV-partiklene for størrelseseksklusjonskromatografi;

- c) å måle eluatets UV-absorbans ved én eller begge av ca. 260 nm og ved ca. 280 nm; og
d) å bestemme V_g av sammensetningen omfattende rAAV-partikler,
hvor den mobile fasen for størrelseseksklusjonskromatografien omfatter et salt, organisk løsningsmiddel eller detergent.

5

6. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5, hvori å utsette sammensetningen for en tilstand der rAAV-partiklene denatureres omfatter:

(i) å utsette sammensetningen for en tilstand som i det vesentlige maksimerer dsDNA SEC-signalet; eller

10 (ii) å utsette sammensetningen for en temperatur som ikke er mer enn 10 °C over minimumstemperaturen som er nødvendig for å denaturere i det vesentlige alt virusgenom i sammensetningen; eller

(iii) å utsette sammensetningen for en tilstand som resulterer i en % fragment DNA-bestemmelse som korrelerer med det % delvis fylte kapsidet av den samme sammensetningen bestemt ved AUC; eller

15 (iv) å utsette sammensetningen for termisk denaturering som i det vesentlige maksimerer dsDNA SEC-signalet; eller

(v) å utsette sammensetningen for termisk denaturering som resulterer i en % fragment DNA-bestemmelse som korrelerer med det % delvis fylte kapsidet av den samme sammensetningen bestemt ved AUC.

20

7. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5, hvori å utsette sammensetningen for en tilstand der rAAV-partiklene denatureres omfatter å inkubere sammensetningen ved en temperatur mellom ca. 65 °C og ca. 95 °C, eventuelt mellom ca. 70 °C og ca. 90 °C, mellom ca. 75 °C og ca. 85 °C, eller mellom ca. 80 °C og ca. 85 °C, fortrinnsvis hvori inkuberingen er ved ca. 70 °C, ca. 75 °C, ca. 80 °C, ca. 85 °C eller ca. 90 °C, mer foretrukket hvori inkuberingen er ved ca. 75 °C, ved ca. 80 °C eller ved ca. 85 °C; eventuelt hvori å utsette sammensetningen for en tilstand der rAAV-partiklene denatureres omfatter å inkubere sammensetningen ved en temperatur mellom ca. 65 °C og ca. 95 °C i mellom ca. 5 minutter og 60 minutter, fortrinnsvis hvori inkuberingen er for ca. 10 minutter, ca. 15 minutter, ca. 20 minutter, ca. 25 minutter, ca. 30 minutter, ca. 35 minutter, ca. 40 minutter, ca. 45 minutter eller ca. 60 minutter, mer foretrukket hvori inkuberingen er for ca. 10 minutter, for ca. 15 minutter eller for ca. 20 minutter.

25

30

35 8. Fremgangsmåten ifølge krav 7, hvori å utsette sammensetningen for en tilstand der rAAV-partiklene denatureres omfatter å inkubere sammensetningen ved en temperatur mellom ca. 65 °C og ca. 95 °C for mellom ca. 5 minutter og 60 minutter i nærværet av en detergent, fortrinnsvis hvori detergenten omfatter SDS,

trimetylammoniumbromid (ETMAB), polysorbat 80, polysorbat 20, Pluronic F-68, eller en kombinasjon derav, eller detergenten har en konsentrasjon mellom ca. 0,005 % og ca. 0,5 %, eller detergenten omfatter mellom ca. 0,005 % og ca. 0,5 % SDS, eller detergenten omfatter ca. 0,05 % SDS; eventuelt hvori i det vesentlige alle viruspartikler i prøven

5 denatureres av denatureringsprosessen, eller minst ca. 95 % av viruspartiklene i prøven denatureres av denatureringsprosessen.

9. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 8, hvori å utsette sammensetningen omfattende de denaturerte rAAV-partiklene for

10 størrelsesseksklusjonskromatografi omfatter å bringe sammensetningen i kontakt med en størrelsesseksklusjonskromatografiharpiks omfattende en nominell porestørrelse mellom ca. 50 nm og ca. 500 nm, fortrinnsvis hvori den nominelle porestørrelsen er ca. 100 nm, 200 nm, 300 nm eller 400 nm, mer foretrukket hvori den nominelle porestørrelsen er ca. 200 nm.

15 10. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9, hvori størrelsesseksklusjonskromatografi omfatter anvendelsen av et høytytelsesvæskechromatografi- eller ultrahøytytelsesvæskechromatografisystem.

20 11. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10, hvori den mobile fasen for størrelsesseksklusjonskromatografien omfatter et salt, organisk løsningsmiddel og detergent.

12. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 11, hvori:

25 (i) den mobile fasen omfatter et salt valgt fra gruppen som består av natriumklorid, natriumacetat, natriumbikarbonat, natriumkarbonat, ammoniumkarbonat, ammoniumklorid, ammoniumnitrat og kombinasjoner derav, fortrinnsvis hvori den mobile fasen omfatter natriumklorid; og/eller

30 (ii) den mobile fasen omfatter en detergent valgt fra gruppen som består av polysorbat 80, poloksamer 188, poloksamer 407, polysorbat 20, Pluronic F-68 eller BRIJ 35, og kombinasjoner derav, fortrinnsvis hvori den mobile fasen omfatter polysorbat 80; og/eller

(iii) den mobile fasen omfatter et organisk løsningsmiddel valgt fra gruppen som består av metanol, isopropanol, acetonitril, dimetylsulfoksid (DMSO), tetrahydrofuran (THF), trifluoretanol (TFE), heksafluorisopropanol (HFIP), og kombinasjoner derav, fortrinnsvis

35 hvori den mobile fasen omfatter metanol.

13. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 12, hvori den mobile fasen for størrelsesseksklusjonskromatografien videre omfatter et buffermiddel, eventuelt

hvor buffermidlet velges fra gruppen som består av natriumfosfat, histidin, natriumsitrat, HEPES, MES, Tris, Bis-Tris, MOPS, TES, Bicin, glysin, Tricin, N-glysyglysin, natriumacetat, natriumkarbonat, glysyglysin, lysin, arginin og kombinasjoner derav, fortrinnsvis hvor buffermidlet er natriumfosfat.

5

14. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 13, hvor den mobile fasen for størrelseseksklusionskromatografien omfatter natriumfosfat, natriumklorid, polysorbat 80 og metanol, eventuelt hvor den mobile fasen omfatter mellom ca. 5 mM og ca. 50 mM natriumfosfat, mellom ca. 100 mM og ca. 500 mM natriumklorid, mellom ca. 0,01 % og ca. 0,5 % polysorbat 80, og mellom ca. 5 % og ca. 50 % metanol og har en pH mellom ca. 6,0 og 8,5; eller den mobile fasen omfatter ca. 10 mM natriumfosfat, ca. 300 mM natriumklorid, ca. 0,05 % polysorbat 80 og ca. 20 % metanol og har en pH på ca. 7,5.

10

15

15. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 14, hvor sammensetningen omfattende rAAV-partikler omfatter mellom ca. 2×10^{10} genomkopi/ml og ca. 1×10^{14} genomkopi/ml.