(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
21 August 2014 (21.08.2014)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2014/125101 A1

(51) International Patent Classification:
C12N 7/02 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(21) International Application Number: PCT/EP2014/052978

(22) International Filing Date: 15 February 2014 (15.02.2014)

(25) Filing Language: French

(26) Publication Language: French

(30) Priority Data:
13/51,295 15 February 2013 (15.02.2013) FR

(71) Applicant: **GENETHON** [FR/FR]; 1 bis, rue de l'Internationale, F-91000 Evry (FR).

(72) Inventors: **LE BEC, Christine**; 9 impasse du parc, F-91100 Corbeil Essonnes (FR). **RIFKI, Mohammed**; 1 villa Auguste Vermorel, F-91000 Evry (FR).

(74) Agents: **SEKHRI, Redha** et al.; Becker & Associes, 25, rue Louis Le Grand, F-75002 Paris (FR).

(81) Designated states *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated states *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
- *with international search report (Article 21(3))*
- *with the sequence listing part of the description (Rule 5(2)(a))*

WO 2014/125101 A1

As printed

(54) Title : METHODS FOR THE PRODUCTION OF DOUBLE-STRANDED AAV VIRAL PARTICLES

(54) Titre : METHODES POUR LA PRODUCTION DE PARTICULES VIRALES AAV DOUBLE BRIN

(57) Abstract : The invention relates to methods for producing double-stranded AAV viral particles using the insect/baculovirus system to produce sufficient amounts of product for therapeutic applications such as gene therapy and/or DNA vaccination, in during clinical or commercial trials.

(57) Abrégé : L'invention concerne des méthodes pour la production de particules virales AAV double brin utilisant le système cellules d'insecte / baculovirus pour la fabrication de quantités suffisantes de produit pour des applications thérapeutiques telles la thérapie génique et/ou la vaccination à ADN, dans des utilisations lors d'essais cliniques ou commerciales.

METHODS FOR THE PRODUCTION OF DOUBLE-STRANDED AAV VIRAL PARTICLES

Abstract: The invention relates to methods for producing double-stranded AAV viral particles using the insect/baculovirus cell system to produce sufficient amounts of product for therapeutic applications such as gene therapy and/or DNA vaccination in uses during clinical or commercial trials.

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to methods for producing double-stranded AAV viral particles using the insect/baculovirus cell system to produce sufficient amounts of product for therapeutic applications such as gene therapy and/or DNA vaccination in uses during clinical or commercial trials.

TECHNOLOGICAL BACKGROUND

The main types of vectors used today in gene therapy are viral vectors, including recombinant adeno-associated virus or rAAV vectors. Numerous animal studies have demonstrated that these vectors can effectively transduce tissues such as the central nervous system, muscles, liver, and retina, and the expression of the transgene persists for long periods[1,2,3]. Moreover, rAAV vectors have the advantage of being non-pathogenic in humans and therefore not very dangerous.

In rAAV vectors, the rep and cap genes flanked by the ITR (inverted terminal repeat) sequences respectively coding

for the replication-regulating proteins and the structural proteins of the capsid are excised and replaced by the transgene (therapeutic gene). The ITR sequences are preserved and are the elements necessary for the replication and encapsidation of the viral genome. In order to produce rAAV vectors, the classical procedure consists of co-transfecting adherent 293 human cells with an rAAV vector plasmid, the Rep-Cap plasmid without the ITRs and the auxiliary plasmid containing the adenoviral genes necessary for replication of the AAV virus. The vectors are generally purified and concentrated by centrifugation or chromatography[4,5,6]. This procedure is cumbersome to implement and relatively ineffective for generating high-titer AAV batches without contamination and in the large amounts necessary for preclinical studies in large animal models or for clinical trials.

rAAV vectors are currently used in numerous phase I/II clinical trials of gene therapy for the treatment of hemophilia B, alpha-1 antitrypsin deficiency, Parkinson's disease, muscular dystrophy diseases such as alpha-sarcoglycanopathy, and Leber congenital amaurosis[1,7,8,9]. New modes of production and purification have been developed in order to simultaneously increase both the titer, i.e. the relative vector concentration, and the vector quality while ensuring large-scale adaptation for a GMP method. At present, the most commonly-used systems are based on 1) the use of stable encapsidation lines, 2) infection in suspension of sf9 insect cells with baculovirus expression vectors, or 3) infection in suspension of BHK hamster cells with HSV (herpes simplex) vectors[10,11]. In particular, sf9 cells

are used today to produce single-stranded AAV vectors on an industrial scale.

The AAV genome is composed of a singled-stranded DNA molecule of 4.7 kb (inactive), the conversion of which to a double-stranded conformation (active form) is a limiting step that can be bypassed by producing "double-stranded" AAV vectors referred to as scAAV (self complementary) vectors[12,13]. Although this new type of vector is highly effective and has been studied in phase I/II clinical trials in hemophilia B, at present, the production of scAAV vectors can only be carried out using the conventional system of transient transfection of adherent HEK293 cells, an inefficient production system for gene therapy treatment of large numbers of patients suffering from hemophilia[6]. Moreover, because of the problems inherent in the double-stranded vector: i) the percentage of empty AAV viral particles, i.e. particles lacking viral DNA, is largely predominant and represents more than 90%, with an inactive product contributing to the immunogenicity of the vector and ii) the viral genome is not exclusively in the form of double-stranded DNA.

The present invention is intended to alleviate these problems and to provide a method for producing double-stranded rAAV particles with an improvement in the ratio of particles containing viral DNA to empty particles and an increased percentage of particles containing a double-stranded genome.

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention relates to a method for producing a high-titer and large-scale double-stranded AAV vector (scAAV)

comprising the suspension culturing of insect cells infected with one or more recombinant baculovirus(es) coding for AAV Rep and Cap proteins and coding for an AAV viral genome containing a transgene of interest, wherein said AAV viral genome is capable of forming a double-stranded genome in the viral particle. The invention allows the large-scale production of human-grade gene therapy vectors in compliance with good manufacturing practice. This method makes it possible to propose industrial production of scAAV vectors for gene therapy.

The invention relates more specifically to a method for producing an scAAV vector, comprising:

a) introduction into an insect cell of the following nucleotide sequences by means of at least one baculovirus vector:

- a sequence coding for a transgene of interest comprised between AAV ITRs, the sequence being selected so as to produce a double-stranded AAV genome;
- at least one sequence coding for AAV capsid proteins; and
- at least one sequence coding for AAV Rep proteins;

b) culturing of said insect cell under conditions allowing the production of an rAAV vector and the harvesting of said rAAV vector.

According to a particular embodiment of the invention, the insect cell is an sf9 cell. According to another particular embodiment, the nucleotide sequences are introduced into the insect cell by means of at least two baculovirus vectors. According to another embodiment, the capsid proteins produced are capsid proteins of an AAV of serotype 9. According to an additional embodiment, Rep proteins of serotype 2 are used. According to another

embodiment, the rAAV vector is a pseudotyped vector (for example an scAAV2/9 vector, i.e. an AAV vector comprising a double-stranded viral genome of serotype 2 encapsidated in an AAV viral particle of serotype 9.

According to an advantageous characteristic, the method according to the invention makes it possible to generate more than 20% full viral rAAV particles, in particular more than 30%, more than 40%, more than 50%, more than 60, 70%, and even more than 80% full viral rAAV particles, i.e. comprising an AAV genome encapsidated within said particles. According to another advantageous characteristic, the method of the invention allows the production of full rAAV particles essentially composed of viral genome in double-stranded form (for example, at least 20, 30, 40 or at least 50% of the particles contain a double-stranded genome). The production of such a percentage of full particles, which moreover contain double-stranded DNA, has never been demonstrated or suggested in the prior art.

DESCRIPTION OF THE FIGURES

Fig. 1 shows (A) a photograph of an SDS-PAGE gel stained with silver nitrate and (B) a photograph of a western blot carried out on a nitrocellulose membrane with a monoclonal B1 antibody allowing identification of viral proteins Vp. The samples are plated in duplicate at 5.10^9 vg and 10^{10} vg, with wells 1 and 2 corresponding to an internal control batch (ssAAV8-GFP, produced with the sf9 system), wells 3 and 4 corresponding to scAAV9 batch no. A.11003.DEV produced in the sf9 cells, wells 5 and 6 corresponding to another scAAV9 batch (no. 12D0106) produced in the sf9 cells and wells 7 and 8 corresponding

to an scAAV9 batch produced in HEK293F cells (batch no. 12D0055).

Fig. 2 is a graph showing the analytical ultracentrifugation distribution profile of scAAV9 batch no. A.12026, DEV#4 produced with the sf9 system (dotted line) and batch 12D0055 produced with the HEK293 system (solid line).

Fig. 3 is a graph showing the analytical ultracentrifugation distribution profile of three scAAV9-SMN batches produced with the sf9 system.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention relates to methods for producing a double-stranded recombinant rAAV vector, or self-complementary AAV (scAAV). The method is based on the use of an insect cell/baculovirus system that is used today for producing single-stranded AAV vectors on an industrial scale but has never been used for producing scAAV vectors. The inventors were able to demonstrate that this system allows the production of better-quality scAAV viral particles compared to those produced by the classical system of HEK293 cells transfected by means of plasmids coding for all of the elements necessary for the production of an rAAV. In particular, the inventors were able to demonstrate that the method according to the invention makes it possible to generate a high percentage of full viral rAAV particles and that the particles produced are essentially composed of viral genome in double-stranded form. Such a quality in the production of scAAV vectors was completely unexpected and shows advantages for the large-scale production of scAAV viruses intended for gene therapy.

The elements of the vector produced according to the invention may be derived from any serotype of AAV. In particular, each element may be derived from an AAV of serotype 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 or 11. Moreover, the constituent elements of the rAAV vectors are not all necessarily derived from the same serotype. Thus, an rAAV vector may be composed of a genome derived from an AAV of serotype 2, for example, encapsidated by capsid proteins derived from an AAV of serotype 9. In this case, one speaks of a pseudotyped vector. The sequences coding for the Rep proteins may also be derived from any serotype of AAV.

According to a particular embodiment, the sequence coding for the capsid proteins is derived from an AAV of serotype 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 or 11. According to a specific variant, the sequence codes for AAV capsid proteins of serotype 9 (AAV9).
According to a particular embodiment, the sequence coding for the Rep proteins is derived from an AAV of serotype 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 or 11. According to a specific variant, the sequence codes for AAV capsid proteins of serotype 2 (AAV2).
According to a particular embodiment, the sequence coding for the AAV viral genome containing the transgene of interest is derived from an AAV of serotype 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 or 11. According to a specific variant, the viral genome is derived from an AAV2 genome.

The AAV viral genome is coded for by a sequence comprising the transgene of interest flanked by AAV ITR sequences. The means for obtaining a double-stranded AAV genome are well known to the person skilled in the art. Specifically, this person may refer to the information

in references 12 and 13 below of McCarty et al. and Wang et al. In summary, another characteristic of deletion of the terminal resolution site (trs) at the level of one of the two ITRs is that this does not separate the strand formed from the neonatal strand and thus allows the production of an AAV viral genome in double-stranded form. Nevertheless, this system is not efficient, and the human cell, which is the natural host cell of the AAV regulation system, is capable of separating and forming a single-stranded AAV viral genome. Moreover, it has been reported that in this system, the production of AAV particles containing an AAV genome is low and represents only 20% of the total viral particles[6].

The transgene of interest may correspond to a protein or an RNA whose expression is desired in a mammalian cell. The transgene of interest may in particular code for a protein or an RNA of therapeutic interest. The person skilled in the art has at his disposal a large amount of information on the proteins or RNA whose expression may be of interest in compensating for the lack of expression or abnormal expression of said protein, or for regulating the expression of such a protein or an RNA. By way of illustration, the examples show the production of a double-stranded rAAV particle whose transgene of interest is the protein SMN. This protein is mutated in spinal muscular atrophy. An scAAV produced according to the invention would allow the expression of a wild-type protein restoring the missing function due to the mutation in a patient.

The various sequences coding for the constituent elements of an AAV viral particle are introduced into one or more different recombinant baculoviruses. Thus, according to

an alternative, the various sequences listed above may be introduced into one and the same recombinant baculovirus. According to an alternative embodiment, two recombinant baculoviruses are used, one coding for AAV Rep and Cap proteins (of identical or different serotype(s)) and the other carrying the viral genome of AAV. According to another embodiment, three baculoviruses are used, each carrying one of the three sequences mentioned above. The genes coding for the proteins of the AAV may be placed under the control of the baculovirus promoters, regulated by the insect cells[16,17].

The insect cell used may be any cell allowing the production of an rAAV. One may mention by way of example sf9 and sf21 cells. According to a particular embodiment, the cell used is an sf9 cell.

Production of the AAV vectors is based on infection of the cells with one or more of the baculoviruses described above. The culture may be carried out in suspension in a suitable medium. As an example of a medium suitable for culturing sf9 cells, one may mention the medium Sf900 III (Life Technologies/Invitrogen). The cells are cultured in a bioreactor of suitable volume, for example greater than 100 mL, in particular greater than 500 mL, 1 L, 2 L, 5 L, 10 L, or even greater than 50 L. According to a particular embodiment, the cells are infected with the recombinant baculovirus(es) at a density of between $0.01 \cdot 10^6$ and $5 \cdot 10^6$ cells/mL, in particular at a cell density of between $0.8 \cdot 10^6$ and $2 \cdot 10^6$ cells/mL, and at a multiplicity of infection (MOI) of between 0.01 and 0/1, in particular at an MOI of 0.05. The cell culture is then maintained in suspension under culturing conditions allowing the production of a recombinant AAV. If the

insect cell used is an sf9 cell, the cells will be maintained in suspension at approximately 27°C for 96 to 144 h.

The vectors are then purified. The purification may comprise a first step of lysis of the cells. The lysis may comprise steps of chemical, mechanical or enzymatic lysis, in particular chemical lysis. According to a variant embodiment, chemical lysis is implemented by adding a detergent solution to the cells, in particular Triton-X-100. The DNA is then degraded by enzymatic digestion, in particular by adding Benzonase. Specifically, the purification step may also comprise a clarification step (e.g. on a 0.45 µm filter). The viral particles may then be further purified on (a) chromatography column(s), by ultracentrifugation, or by a combination of the two approaches. According to a particular embodiment, this purification step on (a) column(s) comprises one or several runs of ion-exchange chromatography. According to a specific embodiment, the ion-exchange chromatography runs are carried out successively using:

1) a cationic resin, for example SP Sepharose (GE Healthcare);

2) an anionic resin in negative mode, for example Fractogel® EMDTMAE, Merck-Millipore), and then

3) an anionic resin such as the resin POROS 50HQ (Life Technologies Invitrogen). The viral rAAV particles can then be concentrated and formulated in a buffer, in particular PBS buffer, for example by tangential filtration (TFF), in order to be at a final concentration of approximately ≥ 10^{11} vg/mL. These concentrated particles may be filtered, in particular through a 0.2 µm filter.

According to a particular aspect, the invention therefore also relates to a method of purifying rAAV particles comprising subjecting a cell lyzate containing rAAV particles to the following successive steps:

- a step of cation resin chromatography in capture mode;
- a step of anion resin chromatography in negative mode; and then
- a step of anion resin chromatography in capture mode.

The cell lyzate subjected to these chromatography steps can be derived from the production steps described above.

According to another aspect, the invention also relates to a set of scAAV particles, in particular scAAV9, produced and optionally purified according to the modalities described above. More particularly, the invention relates to a composition comprising double-stranded rAAV particles, with at least 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, or even at least 80% of the particles being full, i.e. comprising an AAV genome encapsidated within said particles, and these particles being essentially composed of viral genome in double-stranded form, i.e. at least 30%, in particular at least 40%, or even at least 50% of the particles contain a viral genome in double-stranded form.

The invention will be explained in further detail in the examples below, which describe a particular non-limiting embodiment of the invention.

EXAMPLES

Materials and methods

1. Cell culture

a. Insect cell system (sf9)

Production of the scAAV9-SMN vectors with the sf9 baculovirus system is based on infection of insect sf9 cells, culturing of which is carried out in suspension in the medium Sf900 III. Briefly, in a 10 L bioreactor, when the cell concentration is between $0.8 \cdot 10^6$ and $2 \cdot 10^6$ cells/mL, the cells are infected at an MOI of 0.05 with two baculoviruses, one coding for the Rep protein of serotype 2 and the Cap protein of serotype 9 of the AAV vector and the other for the viral genome of the AAV (scSMN transgene). The cell culture is maintained in suspension at 27°C for 96 h to 144 h.

b. Human cell system (HEK293F)

Production of the scAAV9-SMN vectors with the HEK293F/plasmid system is based on the transfection of these cells, culturing of which is carried out in suspension in a medium devoid of animal protein (F17). Briefly, in a 10 L bioreactor, the cells are transfected at the cell concentration of 10^6 cells/mL with three plasmids:

- the auxiliary plasmid pXX6 containing the essential adenovirus genes for the replication of the AAV vector
- the plasmid coding for the Rep protein of serotype 2 and the Cap protein of serotype 9 of the AAV vector
- the plasmid coding for the viral genome of the AAV vector (scSMN transgene) with a total of 20 mg of plasmid in an equimolar amount and 25 mL of PEIpro™ at 1 mg/mL (Polyplus). The cell culture is maintained in suspension at 37°C for 72 h.

2. Purification

Purification of the AAV vectors is carried out from 2 L of culture and takes place in two major steps, the first of which differs slightly for the two types of culture.

a) Step 1

Insect cell system (sf9):

The cells and baculoviruses are chemically lyzed by adding a 0.5% solution of Triton-X-100, and the cellular DNA is then degraded by adding Benzonase (25 U/mL of culture). The solution is then clarified on a 0.45 µm filter. In this step, the sample is referred to as "bulk" and titrated by qPCR using a probe and two primers specific to the AAV viral genome. The nucleotide sequence of the probe is 5'-TAGTTAATGATTAACCC-3' (SEQ ID NO: l), that of primer 1 (sense) is 5'-CTCCATCACTAGGGGTTCCTTG-3 ' (SEQ ID NO:2), and that of primer 2 (antisense) is 5'-GTAGATAAGTAGCATGGC-3' (SEQ ID NO:3).

Human cell system (HEK293F):

The culture is concentrated, formulated in 500 mL by tangential filtration (TFF), the cells are then mechanically lyzed, and the cellular DNA is degraded by adding Benzonase (50 U/mL of culture). The solution is then clarified through a 0.45 µm filter. In this step, the sample is referred to as "bulk" and titrated by qPCR using the probe and the primers whose sequences are given above.

b) Step 2

The exchange chromatography steps are broken down into three parts:

The lyzate filtered on the 0.45 µm membrane is diluted in 50 mM MES buffer, pH 6.0, and then loaded onto a cationic resin (SP Sepharose, GE HealthCare); elution is carried out, with a variant embodiment, at a high salt concentration of up to 200 mM. The chromatography eluate is diluted in 50 mM Trizma base buffer so as to reach a salt concentration of approximately 25 mM and a pH of 8.0 before being loaded in negative mode onto an anionic resin (Fractogel® EMDTMAE, Merck-Millipore). The non-retained fraction is collected and the pH is adjusted to 9.0, after which the solution is loaded onto an anionic resin (POROS 50HQ, Life Technologies Invitrogen) used as a capture step. Elution is carried out at a high salt concentration.

The AAV viral particles are concentrated and formulated in PBS buffer by tangential filtration (TFF) using a cutoff threshold of 100 KDa to a final concentration of approximately ≥ 10^{11} vg/mL and filtered through a 0.2 µm filter.

3. Analyses and characterization of the scAAV9 vector

a) Viral genome titration (vg/mL)-qPCR

The viral genome titer (vg/mL) of the samples representing purification intermediates and purified products was determined by quantitative PCR using the pair probe/primer1/primer2 corresponding to an amplicon located in the ITR region of the transgene plasmid whose sequences are provided above.

b) Purity: SDS-PAGE, silver nitrate staining

The degree of purity of the AAV vectors was evaluated by carrying out gel electrophoresis of the proteins under denaturing conditions (SDS-PAGE),

followed by silver nitrate staining. All of the samples were plated at vg equivalent (5.10^9 vg and 10^{10} vg), and the molecular weight of the proteins was determined using a standard marker of proteins of known molecular weights.

c) Identity of viral proteins Vp of AAV: Western blot

The viral proteins of the AAV capsid (Vp1, Vp2 and Vp3) were identified by carrying out SDS-PAGE followed by transfer to a nitrocellulose membrane and immunofluorescence detection with the monoclonal B1 antibody. All of the samples were plated at vg equivalent ($5{\cdot}10^9$ vg and 10^{10} vg), and the molecular weight of the proteins was determined using a standard marker of proteins of known molecular weights.

d) Analysis of empty and full AAV viral particles: Analytical ultracentrifugation

The sedimentation coefficient of the various AAV viral particles (empty, full, aggregate) and other present populations (subparticles, contaminant proteins, aggregate) in the purified products was determined by real-time centrifugation. Centrifugation of the samples was carried out at a speed of 16,000 rpm using 100 µl or 400 µl of undiluted pure vectors, sedimentation was followed by absorbance at the wavelength of 276 nm, and the sedimentation coefficient of the various populations was obtained using the software SEDFIT.

Results

1. Cell culture and titer in viral genome in purification step 1

In a bioreactor volume of 10 L, two batches of human HEK293F cells (nos. 12D0004 and 12D0082) were transfected

and two batches of insect sf9 cells (nos. A.12026.DEV and 12D0066) were infected, after which 2 L of culture was purified by filtration. In this step, production of the AAV viral particles was quantified by quantitative PCR (Table 1).

Bulk samples 12D0055 and 12D0082 were obtained respectively from culture 12D0004 and 12D0082 (HEK293F), bulk sample A.12026.DEV-4 from culture A.12026.DEV (sf9), and the three bulk samples 12D0066, 12D0070 and 12D0068 from culture 12D0066 (sf9). In this purification step, the two culture systems show similar productivity of AAV viral particles in termes of viral genomes produced per cell (of the order of 10^4 vg/cell) and total amount of viral genomes (approximately 10^{13} vg).

2. Characterization of final scAAV9-SMN vector (after purification step 2)

Purification of the bulk samples was continued by three successive ion-exchange chromatography runs (step 2) using a method described in the literature for obtaining preclinical and clinical grade AAV vectors[14]. Nevertheless, the anionic resin POROS 50HQ, described as unsuitable for purifying the AAV9 vectors produced by the classical method (adherent HEK293 human cells), was found to be effective for capturing the AAV9 vectors produced in suspension. We thus obtained viral scAAV9-SMN preparations whose viral genome titer, purity, identity and quantification of empty and full viral particles were determined. From the six bulk samples harvested in step 1, two batches with the HEK293F system and four batches with the sf9 system were generated, with batch 12D0106 having been obtained by combining bulk samples 12D0066 and 12D0070 (Table 2).

a) Viral genome titration (vg/mL)

The two systems yielded similar productivity with respect to the number of viral genomes (of the order of 10^{11} to 10^{12} vg) and therefore of AAV9 viral particles containing the transgene of interest SMN (referred to as full AAV particles).

b) Purity and identity

The SDS-PAGE and Western blot profiles of the two batches 12D0106 and A.12026.DEV-4 (sf9 system) are identical, with the presence of the three viral proteins Vp1, Vp2 and Vp3 with respective molecular weights of 87 kDa, 72k Da and 62 kDa and the relative amounts of 1 : 1 : 10, corresponding to those expected and to the internal control (Fig. 1A and 1B). This shows that the scAAV9 vectors produced with the sf9 system are pure and that the viral particle is compliant.

The SDS-PAGE and Western blot profile of batch 12D0055 (HEK293F system) shows the presence of very many proteins, some of which are recognized by the B1 antibody and which correspond to degraded viral proteins (Fig. 1A and 1B). This indicates that the scAAV9 vector produced with the HEK293F system is not pure.

The method of chromatography implemented today and identical to the two culture systems does not make it possible to obtain pure batches of scAAV9 vectors produced with the HEK293F system.

c) Analysis of empty and full AAV particles

It has been reported in the literature that the density is approximately 1.32 g/cm^3 (equivalent to 60S) for empty AAV viral particles, i.e. vectors lacking a viral genome, and 1.45 g/cm^3 (equivalent to 110S) for full AAV viral particles, i.e. those containing a viral

genome with a maximum size of 4800 bases[15]. Knowing that the difference in density is sufficiently significant to distinguish them by centrifugation, we have implemented a method today for analytically separating by ultracentrifugation and quantifying the different species present in an AAV viral preparation.

Analytical ultracentrifugation analysis of the scAAV9-SMN vectors was initially carried out by comparing a batch produced in the sf9 system (A.12026.DEV-4) with batch 12D0055 produced in the HEK293 system (Fig. 2). The distribution profile of the species allows the identification of two categories of populations:

a) < 60S corresponding to non-assembled viral proteins and/or contaminants. This population is virtually absent in batch A.12026.DEV-4, while it is present in a non-negligible amount in batch 12D0055. These impurities were also detected in SDS-PAGE (Fig. 1).

b) 60S-110S corresponding to intact AAV viral particles

The 60S-110S population consists of two subpopulations with empty AAV viral particles at 65S and full AAV viral particles between 80S and 110S, with the viral genome in single-stranded form at 90S and double-stranded form at 105S. These values are specific to the scAAV9-SMN vectors and will be redefined according to the type of genome. Highly unexpectedly, we detected very few empty AAV viral particles with the sf9 system compared to the HEK293 system. Moreover, the full AAV viral particles are significantly more enriched in the genome in double-stranded form (105S) with the sf9 system compared to the HEK293 system.

The distribution profile of batch 12D0082 is identical to that of 12D0055, which confirms that the HEK293 system essentially produced very few full AAV particles (< 25%), with only 10% of viral particles containing the genome in double-stranded form.

A second experiment with the three batches of scAAV9-SMN vectors produced in the sf9 system (A.12026.DEV-4, 12D0106, 12D0068) was carried out in the same way by analytical ultracentrifugation (Fig. 3). These three batches all show a similar distribution and confirm that the sf9 system makes it possible to produce AAV viral particles essentially composed of full AAV particles (> 80%), with a very high percentage of viral genome in double-stranded form (> 50%).

Cell culture			Purification: Step 1				
Type	Batch no.	Cells/mL	Bulk no.	Volume (L)	Titer (vg/ml)	Titer (vg/cell)	Total Vg
HEK293F	12D0004	1,0E+06	12D0055	0,5	4.0E+10	4.0E+04	2.0E+13
	12D0082	1,0E+06	12D0082	2	1.2E+10	1.2E+04	2.4E+13
sf9	A.12026.DEV	1,0E+06	A.12026.DEV-4	2	2.2E+10	1.3E+04	4.5E+13
	12D0066	1,9E+06	12D0066	2	1.9E+10	1.0E+04	3.8E+13
			12D0070	2	2.0E+10	1.0E+04	4.0E+13
			12D0068	2	6.4E+09	3.4E+03	1.3E+13

Table 1: Description of the cell concentration in the 10 L bioreactor before transfection or infection and the volumes (L) and titers of viral genomes (vg/mL) obtained after the purification (step 1) of 2 L of cell culture.

Cell culture		Purification				
		Step 1	Step 2			
Type	Batch no.	Bulk no.	Batch no.	Vol (ml)	Titer (vg/mL)	Total Vg
HEK293F	12D0004	12D055	12D0055	0.6	1.6E+12	9.5E+11
	12D0082	12D0082	12D0082	0.8	5.1E+11	4.1E+11
sf9	A.12026.DEV	A.12026.DEV-4	A.12026.DEV-4	1.2	1.4E+12	1.7E+12
	12D0066	12D0066	12D0106	0.8	9.4E+11	7.5E+11
		12D0070				
		12D0068	12D0068	0.5	1.6E+12	8.0E+11

Table 2: Description of the volume and titer of viral genomes (vg/mL), total amount of viral genomes of AAV9 particles (vg) obtained after purification step 2

References

CLAIMS

1. A method for producing a high-titer and large-scale double-stranded AAV (scAAV) vector, comprising the suspension culturing of insect cells infected with one or more recombinant baculovirus vectors coding for AAV Rep and Cap proteins and for an AAV viral genome containing a transgene of interest, wherein said AAV viral genome is capable of forming a double-stranded genome in the viral particle.

2. A method for producing scAAV viral particles, said method allowing the production of scAAV particles, more than 20% of which have encapsidated viral DNA and are functional, comprising the suspension culturing of insect cells infected with one or more recombinant baculovirus vectors coding for AAV Rep and Cap proteins and coding for an AAV viral genome containing a transgene of interest, wherein said AAV viral genome is capable of forming a double-stranded genome in the viral particle.

3. The method according to claim 1 or 2, wherein the insect cell is an sf9 cell.

4. The method according to any one of claims 1 to 3, wherein the insect cells are infected with two baculoviruses, one of the two baculovirus vectors coding for the Rep and Cap proteins, and the other baculovirus vector coding for the AAV viral genome.

5. The method according to any one of claims 1 to 4, wherein the scAAV vector produced is of serotype 9.

6. The method according to any one of claims 1 to 5, further comprising a step of purifying the scAAV vector.

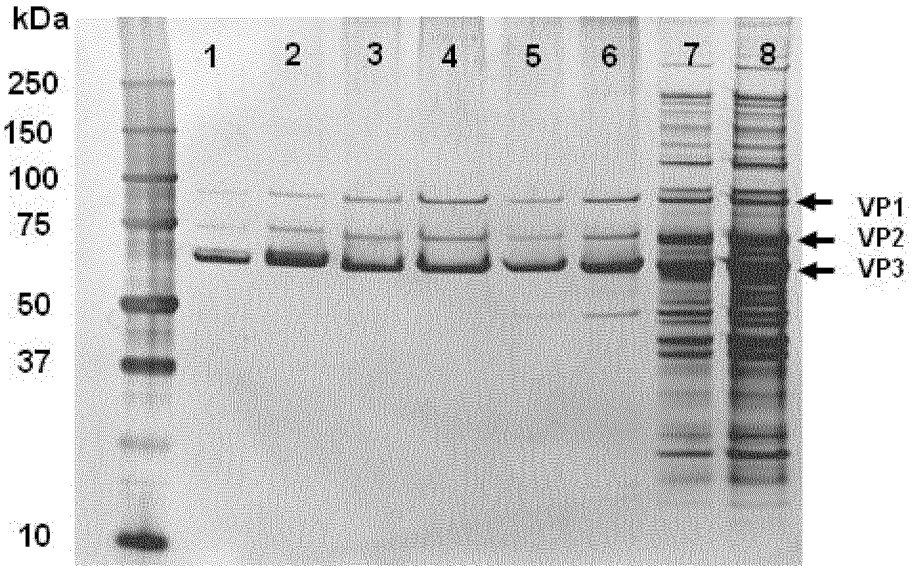
7. The method according to claim 6, wherein the purification comprises the two following steps:
a) lysis of the insect cells; and
b) passage of the lyzate thus obtained through ion-exchange chromatography columns.

8. The method according to claim 7, wherein step b) of ion-exchange chromatography successively comprises passage of the sample over a cationic resin in capture mode, passage over an anionic resin in negative mode, and passage over another anionic resin in capture mode.

9. A method for purifying an scAAV comprising subjecting an scAAV-producing cell lyzate to ion-exchange chromatography columns, successively comprising passage of the sample over a cationic resin in capture mode, passage over an anionic resin in negative mode and passage over another anionic resin in capture mode.

10. Composition comprising scAAV particles, wherein at least 20% of the particles comprise an AAV genome encapsidated within said particles and wherein these particles are essentially composed of viral genome in double-stranded form.

A


kDa
250
150
100
75
50
37
10
1
2
3
4
5
6
7
8
VP1
VP2
VP3

B

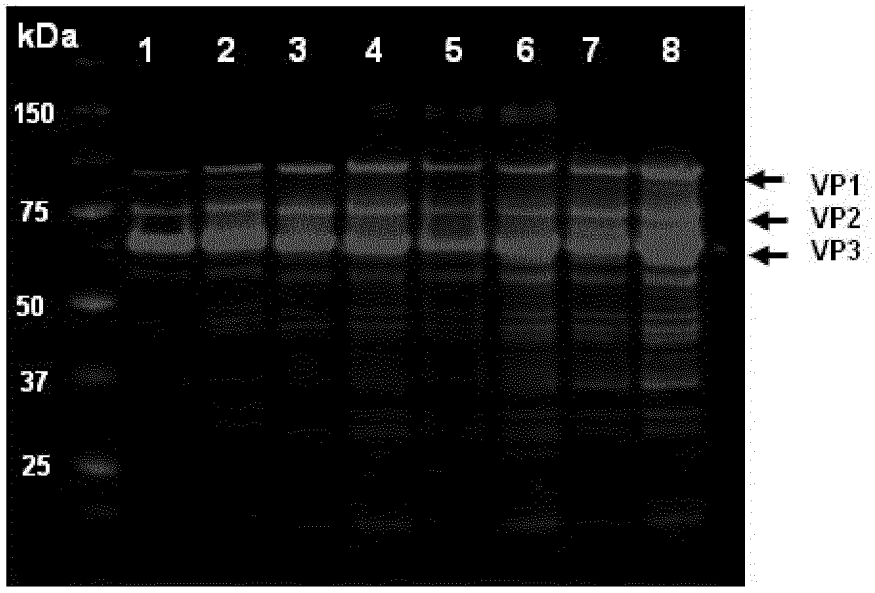

kDa
150
75
50
37
25
1
2
3
4
5
6
7
8
VP1
VP2
VP3

Figure 1

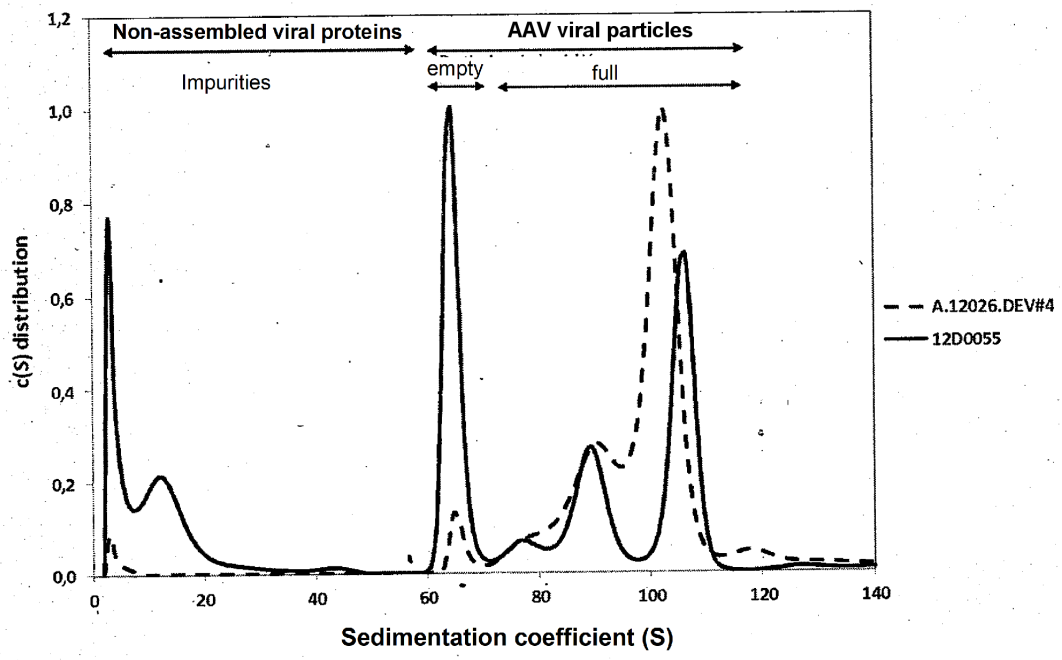


Figure 2

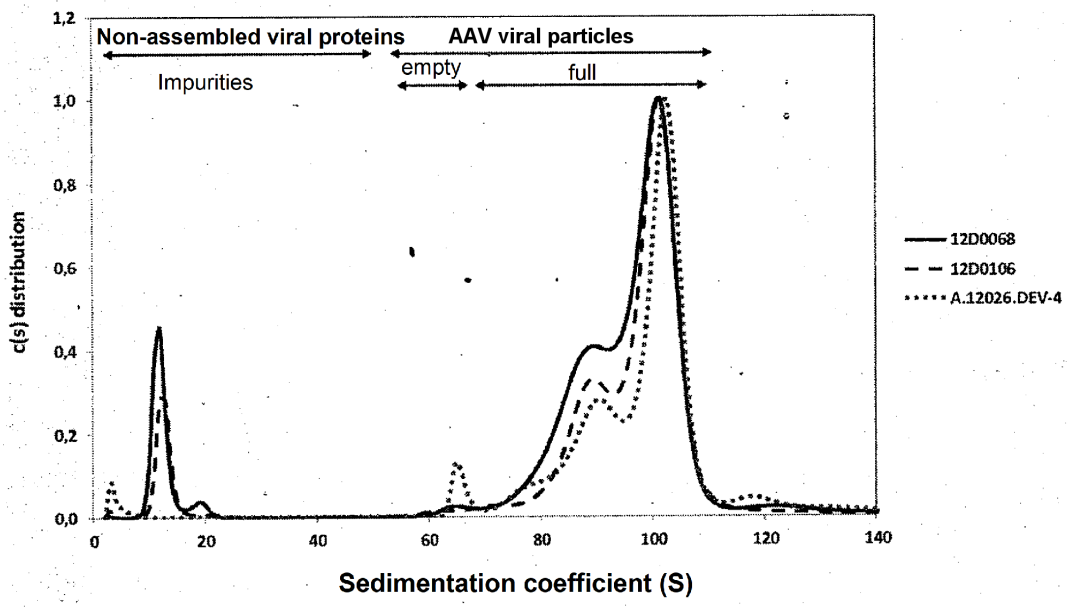


Figure 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/052978

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N7/02 C12N15/86 A61K48/00
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)
C12N A61K

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/122950 A1 (AMSTERDAM MOLECULAR THERAPEUTICS AMT IP B V[NL]; LUBELSKI JACEK [NL];) 6 October 2011 (2011-10-06)	1-6,10
Y	page 6 - page 10; claims 23-29, 42-44	7-9
Y	WO 2011/094198 A1 (PHILADELPHIA CHILDREN HOSPITAL [US]; WRIGHT JOHN FRASER [US]; QU GUANG) 4 August 2011 (2011-08-04) page 14 - page 17	7-9
A	WO 2011/012724 A1 (ASS INST DE MYOLOGIE [FR]; GENETHON [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR];) 3 February 2011 (2011-02-03) page 11	1-5

X Further documents are listed in the continuation of Box C.

X 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)

"0" 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	Date of mailing of the international search report
24 March 2014	03/04/2014

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

2

Form POT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/052978

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2007/084773 A2 (ASKLEPIO BIOPHARMACEUTICAL INC [US]; SAMULSKI RICHARD J [US]; CHEN HAI) 26 July 2007 (2007-07-26) claim 1 - - - - -	1-4
A	TAMAS VIRAG ET AL: "Producing Recombinant Adeno-Associated Virus in Foster Cells: Overcoming Production Limitations Using a Baculovirus-Insect Cell Expression Strategy", HUMAN GENE THERAPY, vol. 20, no. 8, August 2009 (2009-08), pages 807-817, XP055052744, ISSN: 1043-0342, DOI: 10.1089/hum.2009.092 figures 1,4 - - - - -	1-4
A	WO 2008/016391 A2 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR [US]; KAY MARK A [US]; GRIMM DIRK [US]) 7 February 2008 (2008-02-07) page 26 - page 37	1-4

2

Form PCT/ISN210 (continuation of second sheet) April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2014/052978

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2011122950	A1	06-10-2011	NONE		
WO 2011094198	A1	04-08-2011	AU	2011209743 A1	23-08-2012
			CA	2787827 A1	04-08-2011
			CN	102947453 A	27-02-2013
			EP	2529020 A1	05-12-2012
			JP	2013517798 A	20-05-2013
			US	2013072548 A1	21-03-2013
			WO	2011094198 A1	04-08-2011
WO 2011012724	A1	03-02-2011	CA	2769745 A1	03-02-2011
			CN	102498213 A	13-06-2012
			EP	2287323 A1	23-02-2011
			EP	2459723 A1	06-06-2012
			US	2012141422 A1	07-06-2012
				2011012724 A1	03-02-2011
WO 2007084773	A2	26-07-2007	EP	1981548 A2	22-10-2008
			US	2009191597 A1	30-07-2009
			WO	2007084773 A2	26-07-2007
WO 2008016391	A2	07-02-2008	EP	1979485 A2	15-10-2008
			US	2007253936 A1	01-11-2007
			WO	2008016391 A2	07-02-2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2014/052978

Box I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

   ☐ on paper

   ☒ in electronic form

   b. (time)

   ☒ in the international application as filed r

   ☐ together with the international application in electronic form

   ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
21 août 2014 (21.08.2014)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2014/125101 A1

(51) **Classification internationale des brevets** :
C12N 7/02 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(21) **Numéro de la demande internationale** :
PCT/EP2014/052978

(22) **Date de dépôt international** :
15 février 2014 (15.02.2014)

(25) **Langue de dépôt** : français

(26) **Langue de publication** : français

(30) **Données relatives à la priorité** :
1351295 15 février 2013 (15.02.2013) FR

(71) **Déposant** : **GENETHON** [FR/FR]; 1 bis, rue de l'Internationale, F-91000 Evry (FR).

(72) **Inventeurs** : **LE BEC, Christine**; 9 impasse du parc, F-91100 Corbeil Essonnes (FR). **RIFKI, Mohammed**; 1 villa Auguste Vermorel, F-91000 Evry (FR).

(74) **Mandataires** : **SEKHRI, Redha** et al.; Becker & Associes, 25, rue Louis le Grand, F-75002 Paris (FR).

(81) **États désignés** *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible)* : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **États désignés** *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*

— *avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a))*

(54) Title : METHODS FOR THE PRODUCTION OF DOUBLE-STRANDED AAV VIRAL PARTICLES

(54) Titre : METHODES POUR LA PRODUCTION DE PARTICULES VIRALES AAV DOUBLE BRIN

(57) Abstract : The invention relates to methods for producing double-stranded AAV viral particles using the insect/baculovirus cell system to produce sufficient amounts of product for therapeutic applications such as gene therapy and/or DNA vaccination, in uses during clinical or commercial trials.

(57) Abrégé : L'invention concerne des méthodes pour la production de particules virales AAV double brin utilisant le système de cellules d'insecte / baculovirus pour la fabrication de quantités suffisantes de produit pour des applications thérapeutiques telles que la thérapie génique et/ou la vaccination à ADN, dans des utilisations lors d'essais cliniques ou commerciales.

WO 2014/125101 A1

METHODES POUR LA PRODUCTION DE PARTICULES VIRALES AAV DOUBLE BRIN

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention concerne des méthodes pour la production de particules virales AAV double brin utilisant le système de cellules d'insecte / baculovirus pour la fabrication de quantités suffisantes de produit pour des applications thérapeutiques telles que la thérapie génique et/ou la vaccination à ADN, dans des utilisations lors d'essais cliniques ou commerciales.

ARRIERE PLAN TECHNOLOGIQUE

Les principaux types de vecteurs utilisés aujourd'hui en thérapie génique sont les vecteurs viraux, dont les vecteurs recombinants de virus adéno associé ("recombinant adeno-associated virus" ou "rAAV"). De nombreux essais chez l'animal ont démontré que ces vecteurs peuvent transduire efficacement des tissus tels que le système nerveux central, le muscle, le foie, la rétine et que l'expression du transgène persiste à long terme[1,2,3]. De plus, les vecteurs rAAV présentent l'avantage d'être non pathogènes pour l'homme donc peu dangereux.

Dans les vecteurs rAAV, les gènes rep et cap encadrés par les séquences ITR (inverted terminal repeat) codant respectivement pour les protéines régulatrices de la réplication et les protéines structurales de la capside sont excisés et remplacés par le transgène (gène thérapeutique). Les séquences ITR sont conservées et sont les éléments nécessaires pour la réplication et l'encapsidation du génome viral. Pour produire des vecteurs rAAV, la procédure classique consiste à co-transfecter des cellules humaines 293 adhérentes avec un plasmide vecteur rAAV, le plasmide rep-cap sans les ITR et le plasmide auxiliaire contenant les gènes adénoviraux nécessaires à la réplication du virus AAV. Les vecteurs sont généralement purifiés et concentrés par centrifugation ou par chromatographie[4,5,6]. Cette procédure est lourde à mettre en œuvre et relativement inefficace pour générer des lots d'AAV à haut titre, sans contamination et en grande quantité nécessaires pour des essais précliniques chez des modèles animaux de grande taille ou pour des essais cliniques.

Les vecteurs rAAV sont actuellement utilisés dans de nombreux essais cliniques de thérapie génique en phase I/II pour le traitement de l'hémophilie B, le déficit en alpha-1 antitrypsine, la maladie de Parkinson, les maladies de dystrophie musculaire comme l'alpha-sarcoglycanopathie et l'amaurose congénitale de Leber[1,7,8,9]. De nouveaux modes de production et de purification ont été développés pour augmenter à la fois le titre, c'est-à-dire la concentration relative en vecteurs et la qualité des vecteurs tout en assurant une adaptation à grande échelle pour un procédé GMP. A ce jour, les systèmes les plus utilisés reposent sur 1) l'utilisation de lignées stables d'encapsidation, 2) l'infection en suspension des cellules d'insectes sf9 par des vecteurs baculovirus d'expression, ou 3) l'infection en suspension des cellules d'hamster BHK par des vecteurs HSV (herpès simplex)[10,11]. Les cellules sf9 sont notamment utilisées aujourd'hui pour produire des vecteurs AAV simple brin à l'échelle industrielle.

Le génome de l'AAV est composé d'une molécule d'ADN simple brin de 4,7 kb (inactif) dont la conversion en conformation double brin (forme active) est une étape limitante qu'il est possible de contourner en produisant des vecteurs AAV « double brin » notés scAAV (self complementary)[12,13]. Bien que ce nouveau type de vecteur soit très efficace et expérimenté en phase I/II pour l'essai clinique dans l'hémophilie B, la production des vecteurs scAAV n'est encore à ce jour réalisée qu'en utilisant le système traditionnel de transfection transitoire des cellules HEK293 en adhérence, un système de production inefficace pour le traitement par thérapie génique d'un grand nombre de patients atteints d'hémophilie[6]. De plus, dus à des problèmes inhérents au vecteur double brin : i) la proportion de particules virales AAV vides, c'est-à-dire de particules dépourvues d'ADN viral est largement prédominante et représente plus de 90%, un produit inactif contribuant à l'immunogénicité du vecteur ; ii) le génome viral n'est pas exclusivement sous forme d'ADN double brin.

La présente invention vise à pallier ces problèmes et à fournir un procédé pour la production de particules rAAV double brin avec une amélioration du ratio de particules contenant de l'ADN viral par rapport aux particules vides avec une proportion augmentée de particules contenant un génome double brin.

RESUME DE L'INVENTION

L'invention concerne un procédé pour la production d'un vecteur AAV double brin (scAAV) à haut titre et à grande échelle, comprenant la mise en culture en suspension de cellules d'insectes infectées par un ou plusieurs baculovirus recombinants codant les protéines Rep et Cap d'AAV et codant pour un génome viral d'AAV contenant un transgène d'intérêt, ledit génome viral d'AAV étant susceptible de former un génome double brin dans la particule virale. L'invention permet la production à grande échelle de vecteurs de thérapie génique de grade humain dans le respect des bonnes pratiques de fabrication. Ce procédé permet d'envisager une production industrielle de vecteurs scAAV de thérapie génique.

L'invention concerne plus particulièrement un procédé pour la production d'un vecteur scAAV, comprenant:

a) l'introduction, dans une cellule d'insecte, des séquences nucléotidiques suivantes au moyen d'au moins un vecteur baculoviral:

- une séquence codant un transgène d'intérêt compris entre des ITR d'AAV, la séquence étant choisie de manière à produire un génome AAV double brin;
- au moins une séquence codant des protéines de capside d'AAV; et
- au moins une séquence codant des protéines Rep d'AAV;

b) la culture de ladite cellule d'insecte dans des conditions permettant la production d'un vecteur rAAV et la récolte dudit vecteur rAAV.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la cellule d'insecte est une cellule sf9. Selon un autre mode particulier de réalisation, les séquences nucléotidiques sont introduites dans la cellule d'insecte au moyen d'au moins deux vecteurs baculoviraux. Selon un autre mode de réalisation, les protéines de capside produites sont des protéines de capside d'un AAV de sérotype 9. Selon un mode de réalisation supplémentaire, des protéines de Rep de sérotype 2 sont mises en oeuvre. Selon un autre mode de réalisation, le vecteur rAAV est un vecteur pseudotypé (par exemple un vecteur scAAV2/9, c'est-à-dire un vecteur AAV comprenant un génome viral double brin de sérotype 2 encapsidé dans une particule virale AAV de sérotype 9.

Selon une caractéristique avantageuse, le procédé selon l'invention permet de générer plus de 20 % de particules virales rAAV pleines, en particulier plus de 30 %, plus de 40 %, plus de 50

%, plus de 60, 70 %, voire plus de 80 % de particules virales rAAV pleines, c'est-à-dire comprenant un génome AAV encapsidé à l'intérieur desdites particules. Selon une autre caractéristique avantageuse, le procédé de l'invention permet la production de particules rAAV pleines essentiellement composées de génome viral sous forme double brin (par exemple au moins 20, 30, 40 ou au moins 50 % des particules contiennent un génome double brin). La production d'une telle proportion de particules pleines, qui plus est contenant de l'ADN double brin, n'a jamais été montrée au suggérée dans l'état de la technique.

LEGENDE DES FIGURES

La **figure 1** présente (A) une photographie d'un gel SDS-Page coloré au nitrate d'argent et (B) une photographie d'un western blot réalisé sur une membrane de nitrocellulose avec un anticorps monoclonal B1 permettant l'identification des protéines virales Vp. Les échantillons sont déposés en duplicat à 5.10^9 vg et 10^{10} vg, le puits 1 et 2 correspondent à un lot contrôle interne (ssAAV8-GFP, produit avec le système sf9), les puits 3 et 4 correspondent au lot de scAAV 9 n°A.11003.DEV produit dans les cellules sf9, les puits 5 et 6 correspondent à un autre lot (n°12D0106) de scAAV9 produit dans les cellules sf9 et les puits 7 et 8 correspondent au lot de scAAV9 produit dans des cellules HEK293F (lot n°12D0055).
La **figure 2** est un graphique montrant le profil de distribution en ultracentrifugation analytique du lot de scAAV9 n°A.12026.DEV#4 produit avec le système sf9 (trait pointillé) et du lot 12D0055 produit avec le système HEK293 (en trait plein)
La **figure 3** est un graphique montrant le profil de distribution en ultracentrifugation analytique de 3 lots scAAV9-SMN produits avec le système sf9.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

La présente invention concerne des procédés pour la production d'un vecteur rAAV recombinant double brin (ou self-complementary AAV – scAAV – en anglais). Le procédé repose sur l'utilisation du système cellule d'insecte / baculovirus qui est utilisé aujourd'hui pour la production de vecteurs AAV simple brin à l'échelle industrielle mais qui n'avait jamais été utilisé pour la production de vecteurs scAAV. Les inventeurs ont pu montrer que ce système permet la production de particules virales scAAV de meilleure qualité lorsque qu'elles sont comparées à celles produites par le système classique utilisant des cellules HEK293 transfectées au moyen de plasmides codant tous les éléments nécessaires pour la

production d'un rAAV. Les inventeurs ont notamment pu montrer que le procédé selon l'invention permet de générer une proportion élevée de particules virales rAAV pleines et que les particules produites sont essentiellement composées de génome viral sous forme double brin. Une telle qualité dans la production de vecteurs scAAV était totalement inattendue et présente des avantages pour la production à grande échelle de virus scAAV destinés à la thérapie génique.

Les éléments du vecteur produit selon l'invention peuvent être dérivés de tout sérotype d'AAV. En particulier, chaque élément peut être dérivé d'un AAV de sérotype 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11. Par ailleurs, les éléments constitutifs du vecteurs rAAV ne sont pas nécessairement tous dérivés du même sérotype. Ainsi, un vecteur rAAV peut être composé d'un génome dérivé d'un AAV de sérotype 2, par exemple, encapsidé par des protéines de capside dérivées d'un AAV de sérotype 9. On parle alors d'un vecteur pseudotypé. Les séquences codant pour les protéines Rep peuvent également être dérivées de tout sérotype d'AAV.

Selon un mode particulier de réalisation, la séquence codant les protéines de capside est dérivée d'un AAV de sérotype 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11. Selon une variante spécifique, la séquence code des protéines de capside d'AAV de sérotype 9 (AAV9).
Selon un mode particulier de réalisation, la séquence codant les protéines Rep est dérivée d'un AAV de sérotype 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11. Selon une variante spécifique, la séquence code des protéines de capside d'AAV de sérotype 2 (AAV2).
Selon un mode particulier de réalisation, la séquence codant le génome viral d'AAV contenant le transgène d'intérêt est dérivée d'un AAV de sérotype 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11. Selon une variante spécifique, le génome viral est dérivé d'un génome d'AAV2.

Le génome viral d'AAV est codé par une séquence comprenant le transgène d'intérêt flanqué de séquences ITR d'AAV. Les moyens d'obtenir un génome AAV double brin sont bien connus de l'homme du métier. Il pourra notamment se référer aux informations des références 12 et 13 ci-dessous, de McCarty et al. et de Wang et al. En résumé, la suppression du Site Terminal de Résolution (trs) au niveau d'un des deux ITR a pour autre caractéristique de ne pas séparer le brin formé du brin néonatal et ainsi de permettre la production d'un génome viral AAV sous forme double brin. Néanmoins, ce système n'est pas efficace et la cellule humaine, qui est la cellule hôte naturelle du système de régulation de l'AAV, est capable de

séparer et de former un génome viral AAV simple brin. Par ailleurs, il a été décrit que dans ce système, la production de particules AAV contenant un génome AAV est faible et ne représente que 20% de la totalité des particules virales[6].

Le transgène d'intérêt peut correspondre à une protéine ou à un ARN dont l'expression est souhaitée dans une cellule de mammifère. Le transgène d'intérêt peut en particulier coder une protéine ou un ARN ayant un intérêt thérapeutique. L'homme du métier a à sa disposition une grande quantité d'information sur les protéines ou ARN dont l'expression peut avoir un intérêt pour compenser l'absence d'expression ou l'expression anormale de ladite protéine, ou pour réguler l'expression d'une telle protéine ou d'un ARN. A titre illustratif, les exemples montrent la production d'une particule rAAV double brin dont le transgène d'intérêt est la protéine SMN. Cette protéine est mutée dans l'amyotrophie spinale. Un scAAV produit selon l'invention permettrait l'expression d'une protéine sauvage restaurant la fonction absente due à la mutation chez un patient.

Les différentes séquences codant les éléments constitutifs d'une particule virale AAV sont introduites dans un ou plusieurs baculovirus recombinants différents. Ainsi, selon une alternative, les différentes séquences listées ci-dessus peuvent être introduites dans un seul et même baculovirus recombinant. Selon un mode de réalisation alternatif, deux baculovirus recombinants sont utilisés, l'un codant les protéines Rep et Cap d'AAV (de sérotype(s) identique ou différents) et l'autre portant le génome viral de l'AAV. Selon un autre mode de réalisation, trois baculovirus sont utilisés, chacun portant l'une des trois séquences mentionnées ci-avant. Les gènes codant les protéines de l'AAV peuvent être placés sous le contrôle des promoteurs du baculovirus, régulés par les cellules d'insectes[16, 17].

La cellule d'insecte utilisée peut être toute cellule permettant la production d'un rAAV. On peut citer à titre d'exemple les cellules sf9 et sf21. Selon un mode particulier de réalisation, la cellule utilisée est une cellule sf9.

La production des vecteurs AAV est basée sur l'infection des cellules avec un ou plusieurs des baculovirus décrits ci-dessus. La culture peut être réalisée en suspension, dans un milieu approprié. A titre de milieu approprié pour la culture de cellules sf9, on peut citer le milieu Sf900III (Life technologies/Invitrogen). Les cellules sont cultivées dans un bioréacteur de volume approprié, par exemple supérieur à 100 mL, notamment supérieur à 500 mL, à 1 L, à

2 L, à 5 L, à 10 L, voire supérieur à 50 L. Selon un mode particulier de réalisation, les cellules sont infectées par le ou les baculovirus recombinant à une densité comprise entre $0{,}01.10^6$ et 5.10^6 cellules/mL, en particulier à une densité cellulaire comprise entre $0{,}8.10^6$ et 2.10^6 cellules/mL, et à une multiplicité d'infection (MOI) comprise entre 0,01 et 0,1 en particulier à une MOI de 0,05. La culture cellulaire est ensuite maintenue en suspension dans des conditions de culture permettant la production d'un AAV recombinant. Si la cellule d'insecte utilisée est une cellule sf9, elles seront maintenues en suspension à environ 27°C pendant 96 à 144 heures.

Les vecteurs sont ensuite purifiés. La purification peut comprendre une première étape de lyse des cellules. La lyse peut comprendre des étapes de lyse chimique, mécanique ou enzymatique, notamment chimique. Selon une variante de réalisation, une lyse chimique est mise en œuvre, par addition d'une solution de détergent aux cellules, notamment de Triton-X100. L'ADN est ensuite dégradé par digestion enzymatique, notamment par addition de benzonase. L'étape de purification peut notamment également comprendre une étape de clarification (e.g. sur filtre 0,45 µm). Les particules virales peuvent ensuite être davantage purifiées sur colonne(s) de chromatographie ou par ultracentrifugeuse ou par une combinaison des deux approches. Selon un mode particulier de réalisation, cette étape de purification sur colonne(s) comprend une ou plusieurs chromatographies échangeuses d'ions. Selon un mode spécifique de réalisation, les chromatographies échangeuses d'ions emploient successivement:
1) une résine cationique, par exemple SP sepharose (GE Healthcare);
2) une résine anionique en mode négatif, par exemple Fractogel® EMDTMAE, Merck-Millipore), puis
3) une résine anionique telle que la résine POROS 50HQ (Life Technologies Invitrogen). Les particules virales rAAV peuvent ensuite être concentrées et formulées dans un tampon, notamment tampon PBS, par exemple par filtration tangentielle (TFF) pour être à une concentration finale d'environ $\geq 10^{11}$ vg/ml. Ces particules concentrées peuvent être filtrées, notamment sur un filtre de 0,2 µm.

Selon un aspect particulier, l'invention se rapporte donc également à un procédé de purification de particules rAAV comprenant la soumission d'un lysat cellulaire contenant des particules rAAV aux étapes successives suivantes:
- une étape de chromatographie sur résine cationique en mode capture;
- une étape de chromatographie sur résine anionique en mode négatif; puis

- une étape de chromatographie sur résine anionique en mode capture.

Le lysat cellulaire soumis à ces étapes de chromatographie peut être issus des étapes de production développées ci-dessus.

Selon un autre aspect, l'invention concerne également un ensemble de particules scAAV, en particulier scAAV9, produit et éventuellement purifiées selon les modalités décrites ci-dessus. Plus particulièrement, l'invention concerne une composition comprenant des particules rAAV double brin, au moins 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, voire au moins 80 % des particules étant pleines, c'est-à-dire comprenant un génome AAV encapsidé à l'intérieur desdites particules et ces particules étant essentiellement composées de génome viral sous forme double brin, i.e. au moins 30 %, en particulier au moins 40 %, voire au moins 50% des particules contiennent un génome viral sous forme double brin.

L'invention sera davantage détaillée dans les exemples ci-dessous qui décrivent un mode de réalisation particulier, non limitatif, de l'invention.

EXEMPLES

Matériels et Méthodes

1. Culture cellulaire

   a. *Système de cellules d'insecte (sf9)*

La production des vecteurs scAAV9-SMN avec le système sf9/baculovirus est basée sur l'infection des cellules d'insectes sf9 dont la culture est réalisée en suspension dans le milieu Sf900III. Brièvement, dans un bioréacteur de 10L, lorsque la concentration cellulaire est comprise entre $0{,}8.10^6$ à 2.10^6 cellules/ml, les cellules sont infectées à une MOI de 0,05 par deux baculovirus, l'un codant pour les protéines Rep de sérotype 2 et Cap de sérotype 9 du vecteur AAV et l'autre pour le génome viral de l'AAV (transgène scSMN). La culture cellulaire est maintenue en suspension à 27°C entre 96h et 144h.

   b. *Système de cellules humaines (HEK293F)*

La production des vecteurs scAAV9-SMN avec le système HEK293F/plasmide est basée sur la transfection de ces cellules dont la culture est réalisée en suspension dans un milieu

dépourvu en protéine animale (F17). Brièvement, dans un bioréacteur de 10L, les cellules sont transfectées à la concentration cellulaire de 10^6 cellules/ml par 3 plasmides:

- le plasmide auxiliaire pXX6 contenant les gènes de l'adenovirus essentiels pour la réplication du vecteur AAV
- le plasmide codant pour les protéines Rep de sérotype 2 et Cap de sérotype 9 du vecteur AAV
- le plasmide codant pour le génome viral du vecteur AAV (transgène scSMN)

avec 20 mg total de plasmide en quantité équimolaire et 25 mL de PEIpro™ à 1 mg/ml (Polyplus). La culture cellulaire est maintenue en suspension à 37°C pendant 72h.

2. Purification

La purification des vecteurs AAV est réalisée à partir de 2 L de culture et se déroulent en 2 grandes étapes dont la première est légèrement différente pour les 2 types de culture.

a) Etape 1

Système cellules d'insecte (sf9) :

Les cellules et les baculovirus sont lysés chimiquement par addition d'une solution de Triton-X100 à 0,5% puis l'ADN cellulaire est dégradé par addition de benzonase (25U/ml de culture). La solution est ensuite clarifiée sur filtre 0,45µm. A cette étape, l'échantillon est dénommé « vrac » et titré par qPCR en utilisant une sonde et deux amorces spécifiques du génome viral AAV. La séquence nucléotidique de la sonde est 5'-TAGTTAATGATTAACCC-3' (SEQ ID NO:1), celle de l'amorce 1 (sens) est 5'-CTCCATCACTAGGGGTTCCTTG-3' (SEQ ID NO:2) et de l'amorce 2 (antisens) est 5'-GTAGATAAGTAGCATGGC-3' (SEQ ID NO:3).

Système cellules humaines (HEK293F) :

La culture est concentrée, formulée dans 500 ml par filtration tangentielle (TFF), les cellules sont ensuite lysées mécaniquement et l'ADN cellulaire est dégradé par addition de benzonase (50U/ml de culture). La solution est ensuite clarifiée sur filtre 0,45µm. A cette étape, l'échantillon est dénommé « vrac » et titré par qPCR en utilisant la sonde et les amorces dont les séquences sont fournies ci-dessus.

b) Etape 2

Les étapes de chromatographies échangeuses se décompose en trois parties :

Le lysat filtré sur membrane 0,45 µm est dilué dans un tampon MES 50 mM pH 6.0 puis chargé sur une résine cationique (SP sepharose, GE healthcare) ; l'élution est effectuée, avec variante de réalisation, à forte concentration en sel jusqu'à 200 mM. L'éluât de chromatographie est dilué dans un tampon Trizma base 50 mM afin d'avoir une concentration en sel d'environ 25 mM et un pH 8.0 avant d'être chargé en mode négatif sur une résine anionique (Fractogel® EMDTMAE, Merck-Millipore). La fraction non retenue est collectée et le pH est ajusté à pH 9.0 puis la solution est chargée sur une résine anionique (POROS 50HQ, Life tehnologies Invitrogen) utilisée comme une étape de capture. L'élution est réalisée à forte concentration en sel.

Les particules virales AAV sont concentrées et formulées dans un tampon PBS par filtration tangentielle (TFF) utilisant un seuil de coupure de 100KDa pour être à une concentration finale d'environ $\geq 10^{11}$ vg/ml et filtrées sur 0,2µm.

3. Analyses et caractérisation du vecteur scAAV9

a) Titration en génome viral (vg/ml) - qPCR

Le titre en génome viral (vg/mL) des échantillons représentant des intermédiaires de purification et des produits purifiés a été déterminé par PCR quantitative en utilisant le couple sonde/amorce1/amorce2 correspondant à un amplicon situé dans la région ITR du plasmide transgène dont les séquences sont fournies ci-dessus.

b) Pureté : SDS-PAGE, coloration au nitrate d'argent

Le degré de pureté des vecteurs AAV a été évalué en réalisant un gel d'électrophorèse des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) suivie d'une coloration au nitrate d'argent. Tous les échantillons ont été déposés à vg équivalent (5.10^9 vg et 10^{10} vg), la masse molaire des protéines a été déterminée à l'aide d'un marqueur de protéines standards de masses molaires connues.

c) Identité des protéines virales Vp de l'AAV: Western blot

Les protéines virales de la capside de l'AAV (Vp1, Vp2 et Vp3) ont été identifiées en réalisant un gel SDS-PAGE suivie d'un transfert sur membrane de nitrocellulose et d'une détection par immunofluorescence avec l'anticorps monoclonal B1. Tous les échantillons ont

été déposés à vg équivalent (5.10^9 vg et 10^{10} vg), la masse molaire des protéines a été déterminée à l'aide d'un marqueur de protéines standards de masses molaires connues.

d) Analyse des particules virales AAV vides et pleines : Ultracentrifugation analytique

Le coefficient de sédimentation des différentes particules virales d'AAV (vide, pleine, agrégat) et autres populations présentes (subparticules, protéines contaminantes, agrégat) dans les produits purifiés a été déterminé par centrifugation en temps réel. La centrifugation des échantillons a été réalisée à une vitesse de 16000 rpm en utilisant 100µl ou 400 µl de vecteurs purs non dilués, la sédimentation a été suivie par absorbance à la longueur d'onde de 276 nm, le coefficient de sédimentation des différentes populations a été obtenu en utilisant le logiciel SEDFIT.

Résultats

1. Culture cellulaire et titre en génome viral à l'étape 1 de purification.

Dans un volume de bioréacteur de 10L, deux lots de cellules humaines HEK293F (n° 12D0004 et 12D0082) a été transfecté et deux lots de cellules d'insectes sf9 (n° A.12026.DEV et 12D0066) ont été infectés, puis 2L de culture ont été purifiés par filtration. A cette étape, la production des particules virales d'AAV a été quantifiée par PCR quantitative (tableau 1).

Le vrac 12D0055 et 12D0082 ont été obtenus respectivement à partir de la culture 12D0004 et 12D0082 (HEK293F), le vrac A.12026.DEV-4 à partir de la culture A.12026.DEV (sf9) et les 3 vracs 12D0066, 12D0070 et 12D0068 à partir de la culture 12D0066 (sf9). A cette étape de purification, les 2 systèmes de culture montrent une productivité similaire de particules virales d'AAV en termes de génomes viraux produits par cellule (de l'ordre de 10^4 vg/cellule) et de quantité totale de génomes viraux (environ 10^{13} vg).

2. Caractérisation du vecteur scAAV9-SMN final (après étape 2 de purification)

La purification des vracs a été poursuivie par 3 chromatographies successives à échange d'ions (étape 2) en appliquant un procédé décrit dans la littérature pour l'obtention de vecteurs AAV de grade précliniques et cliniques[14]. Cependant, la résine anionique POROS 50HQ, décrite comme non appropriée pour purifier les vecteurs AAV9 produits avec la méthode classique (cellules humaines HEK293 adhérentes), s'est révélée efficace pour

capturer les vecteurs AAV9 produits en suspension. Nous avons ainsi obtenu des préparations virales scAAV9-SMN dont le titre en génome viral, la pureté, l'identité et la quantification des particules virales vides et pleines ont été déterminés. A partir des 6 vracs récoltés à l'étape 1, deux lots avec le système HEK293F et quatre lots avec le système sf9 ont été générés, le lot 12D0106 ayant été obtenu en réunissant les vracs 12D0066 et 12D0070 (tableau 2).

a) Titration en génome viral (vg/ml)

Les 2 systèmes conduisent à une productivité similaire en ce qui concerne le nombre de génome viral (de l'ordre de 10^{11} à 10^{12} vg) et donc de particules virales d'AAV9 contenant le transgène d'intérêt SMN (dénommées particules d'AAV pleines).

b) Pureté et identité

Le profil en SDS-Page et Western blot de 2 lots 12D0106 et A.12026.DEV-4 (système sf9) sont identiques avec la présence des 3 protéines virales Vp1, Vp2 et Vp3 de masses molaires respectivement de 87 kDa, 72kDa et 62 kDa et les quantités relatives de 1 :1 :10, correspondant à celles attendues et au contrôle interne (fig1A et 1B). Ceci montre que les vecteurs scAAV9-produits avec le système sf9 sont purs et que la particule virale est conforme.

Le profil en SDS-Page et en Western blot du lot 12D0055 (système HEK293F) montre la présence de très nombreuses protéines dont certaines sont reconnues par l'anticorps B1 et qui correspondent à protéines virales dégradées (fig1A et 1B). Ceci indique que le vecteur scAAV9 produit avec le système HEK293F n'est pas pur.

Le procédé de chromatographie mis en place aujourd'hui et identique aux 2 systèmes de culture, ne permet pas d'obtenir des lots purs de vecteurs scAAV9 produits avec le système HEK293F.

c) Analyse des particules d'AAV vides et pleines

Il a été décrit dans la littérature que la densité est approximativement de 1,32 g/cm3 (équivalent à 60S) pour les particules virales AAV vides, c'est-à-dire les vecteurs dépourvus de génome viral et de 1,45 g/cm3 (équivalent à 110S) pour les particules virales AAV pleines, c'est-à-dire ceux contenant un génome viral de taille maximale de 4800 bases[15]. Sachant que la différence de densité est suffisamment significative pour les distinguer par centrifugation, nous avons aujourd'hui mis en place une méthode pour séparer analytiquement par

ultracentrifugation et quantifier les différentes espèces présentes dans une préparation virale d'AAV.

L'analyse en ultracentrifugation analytique des vecteurs scAAV9-SMN a été réalisée dans un premier temps en comparant un lot produit en système sf9 (A.12026.DEV-4) avec le lot 12D0055 produit en système HEK293 (figure 2). Le profil de distribution des espèces permet d'identifier 2 catégories de populations:

a) < 60S correspondant à des protéines virales non assemblées et/ou contaminants. Cette population est quasiment absente dans le lot A.12026.DEV-4 alors qu'elles sont présentes en quantité non négligeable dans le lot 12D0055. Ces impuretés ont également été détectées en SDS-Page (figure 1).
b) 60S - 110S correspondant à des particules virales AAV intactes

La population « 60S-110S » se décline en 2 sous-populations avec les particules virales d'AAV vides à 65S et les particules virales d'AAV pleines entre 80S et 110S avec le génome viral sous la forme simple brin à 90S et sous la forme double brin à 105S. Ces valeurs sont spécifiques aux vecteurs scAAV9-SMN et seront redéfinies en fonction du type du génome. De façon très inattendue, nous avons détecté très peu de particules virales d'AAV vides avec le système sf9 comparée au système HEK293. De plus, les particules virales AAV pleines sont nettement plus enrichies en génome sous forme double brin (105S) avec le système sf9 comparée au système HEK293.
Le profil de distribution du lot 12D0082 est identique à celui du lot 12D0055, ce qui confirme que le système HEK293 produit essentiellement très peu de particules AAV pleines (< 25%) avec seulement 10% de particules virales contenant le génome sous forme double brin.

Une seconde expérience avec les 3 lots de vecteurs scAAV9-SMN produits en système sf9 (A.12026.DEV-4, 12D0106, 12D0068) a été réalisée de la même façon par ultracentrifugation analytique (figure 3). Ces 3 lots montrent tous un profil de distribution similaire et confirme que le système sf9 permet de produire des particules virales d'AAV essentiellement composées de particules d'AAV pleines (>80%) avec une très forte proportion de génome viral sous forme double brin (>50%).

Culture cellulaire			Purification: Etape 1				
Type	Lot N°	Cellule/ml	Vrac N°	Volume (L)	Titre (vg/ml)	Titre (vg/cellule)	Total Vg
HEK293F	12D0004	1,0E+06	12D0055	0,5	4,0E+10	4,0E+04	2,0E+13
	12D0082	1,0E+06	12D0082	2	1,2E+10	1,2E+04	2,4E+13
sf9	A.12026.DEV	1,0E+06	A.12026.DEV-4	2	2,2E+10	1,3E+04	4,5E+13
	12D0066	1,9E+06	12D0066	2	1,9E+10	1,0E+04	3,8E+13
			12D0070	2	2,0E+10	1,0E+04	4,0E+13
			12D0068	2	6,4E+09	3,4E+03	1,3E+13

Tableau 1 : Description de la concentration cellulaire dans le bioréacteur de 10L avant transfection ou infection, des volumes (L) et des titres en génomes viraux (vg/ml) obtenus après la purification (étape 1) de 2L culture cellulaire.

Culture cellulaire		Purification				
Type	Lot N°	Etape 1	Etape 2			
		Vrac N°	Lot N°	Vol (ml)	Titre (vg/mL)	Total Vg
HEK293F	12D0004	12D055	12D0055	0,6	1,6E+12	9,5E+11
	12D0082	12D0082	12D0082	0,8	5,1E+11	4,1E+11
sf9	A.12026.DEV	A.12026.DEV-4	A.12026.DEV-4	1,2	1,4E+12	1,7E+12
	12D0066	12D0066	12D0106	0,8	9,4E+11	7,5E+11
		12D0070				
		12D0068	12D0068	0,5	1,6E+12	8,0E+11

Tableau 2 : Description du volume, du titre en génomes viraux (vg/ml), quantité totale de génomes viraux de particules d'AAV9 (vg) obtenus après l'étape 2 de purification

Références bibliographiques

1 Grieger JC, Samulski RJ. Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications. Methods Enzymol 2012; 507: 229-254.

2 Asokan A, Schaffer DV, Samulski RJ. The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads. Mol Ther 2011; 20: 699-708.

3 Wright JF, Wellman J, High KA. Manufacturing and regulatory strategies for clinical AAV2-hRPE65. Curr Gene Ther 2010; 10: 341-349.

4 Burova E, Ioffe E. Chromatographic purification of recombinant adenoviral and adeno-associated viral vectors: methods and implications. Gene Ther 2005; 12 Suppl 1: S5-17.

5 Grieger JC, Choi VW, Samulski RJ. Production and characterization of adeno-associated viral vectors. Nat Protoc 2006; 1: 1412-1428.

6 Allay JA et al. Good manufacturing practice production of self-complementary serotype 8 adeno-associated viral vector for a hemophilia B clinical trial. Hum Gene Ther 2011; 22: 595-604.

7 Nathwani AC et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. N Engl J Med 2012; 365: 2357-2365.

8 Simonelli F et al. Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration. Mol Ther 2010; 18: 643-650.

9 Flotte TR et al. Phase 2 clinical trial of a recombinant adeno-associated viral vector expressing alpha1-antitrypsin: interim results. Hum Gene Ther 2011; 22: 1239-1247.

10 Cecchini S, Virag T, Kotin RM. Reproducible high yields of recombinant adeno-associated virus produced using invertebrate cells in 0.02- to 200-liter cultures. Hum Gene Ther 2011; 22: 1021-1030.

11 Davidoff AM et al. Purification of recombinant adeno-associated virus type 8 vectors by ion exchange chromatography generates clinical grade vector stock. J Virol Methods 2004; 121: 209-215.

12 McCarty DM et al. Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. Gene Ther 2003; 10: 2112-2118.

13 Wang Z et al. Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. Gene Ther 2003; 10: 2105-2111.

14 Zhou J et al. PEG-modulated column chromatography for purification of recombinant adeno-associated virus serotype 9. J Virol Methods 2011; 173: 99-107.

15 de la Maza LM, Carter BJ. Heavy and light particles of adeno-associated virus. J Virol 1980; 33: 1129-1137.

16 Galibert L et al. Latest developments in the large-scale production of adeno-associated virus vectors in insect cells toward the treatment of neuromuscular diseases. *J Invertebr Pathol* 2011; **107 Suppl:** S80-93.

17 Virag T, Cecchini S, Kotin RM. Producing recombinant adeno-associated virus in foster cells: overcoming production limitations using a baculovirus-insect cell expression strategy. *Hum Gene Ther* 2009; **20:** 807-817.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour la production d'un vecteur AAV double brin (scAAV) à haut titre et à grande échelle, comprenant la mise en culture en suspension de cellules d'insectes infectées par un ou plusieurs vecteurs baculoviraux recombinants codant les protéines Rep et Cap d'AAV et pour un génome viral d'AAV contenant un transgène d'intérêt, ledit génome viral d'AAV étant susceptible de former un génome double brin dans la particule virale.

2. Procédé pour la production de particules virales scAAV, le procédé permettant la production de particules scAAV dont plus de 20 % ont encapsidé de l'ADN viral et sont fonctionnelles, comprenant la mise en culture en suspension de cellules d'insectes infectées par un ou plusieurs vecteurs baculoviraux recombinants codant les protéines Rep et Cap d'AAV et codant pour un génome viral d'AAV contenant un transgène d'intérêt, ledit génome viral d'AAV étant susceptible de former un génome double brin dans la particule virale.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, la cellule d'insecte étant une cellule sf9.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, les cellules d'insecte étant infectées au moyen de deux baculovirus, l'un des deux vecteurs baculoviraux codant les protéines Rep et Cap, et l'autre vecteur baculoviral codant le génome viral d'AAV.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel le vecteur scAAV produit est de sérotype 9.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, comprenant en outre une étape de purification du vecteur scAAV.

7. Procédé selon la revendication 6, la purification comprenant les deux étapes suivantes:
a) lyse des cellules d'insecte; et
b) passage du lysat ainsi obtenu sur des colonnes de chromatographie échangeuse d'ions.

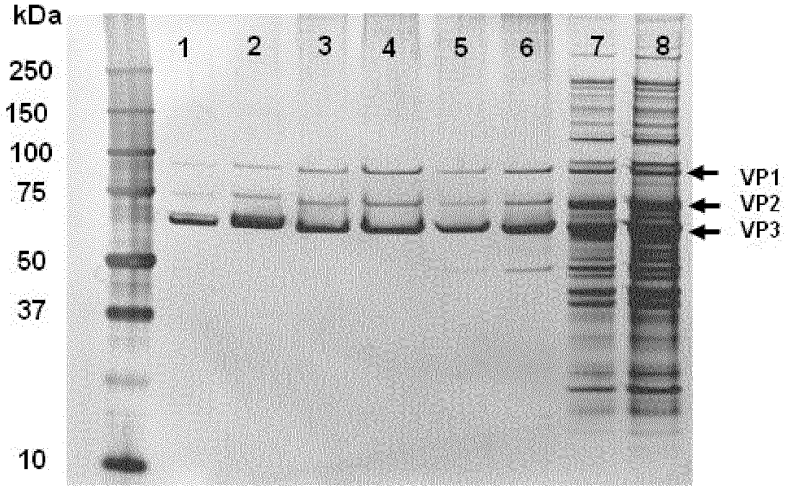
8. Procédé selon la revendication 7, dans lequel l'étape b) de chromatographie échangeuse d'ions comprend successivement un passage de l'échantillon sur une résine cationique en

mode capture, un passage sur une résine anionique en mode négatif et un passage sur une autre résine anionique en mode capture.

9. Procédé de purification d'un scAAV comprenant la soumission d'un lysat de cellule produisant des scAAV sur des colonnes de chromatographie échangeuse d'ions, comprenant successivement un passage de l'échantillon sur une résine cationique en mode capture, un passage sur une résine anionique en mode négatif et un passage sur une autre résine anionique en mode capture.

10. Composition comprenant des particules scAAV, au moins 20 % des particules comprenant un génome AAV encapsidé à l'intérieur desdites particules et ces particules étant essentiellement composées de génome viral sous forme double brin.

A


kDa
250
150
100
75
50
37
10
1
2
3
4
5
6
7
8
VP1
VP2
VP3

B

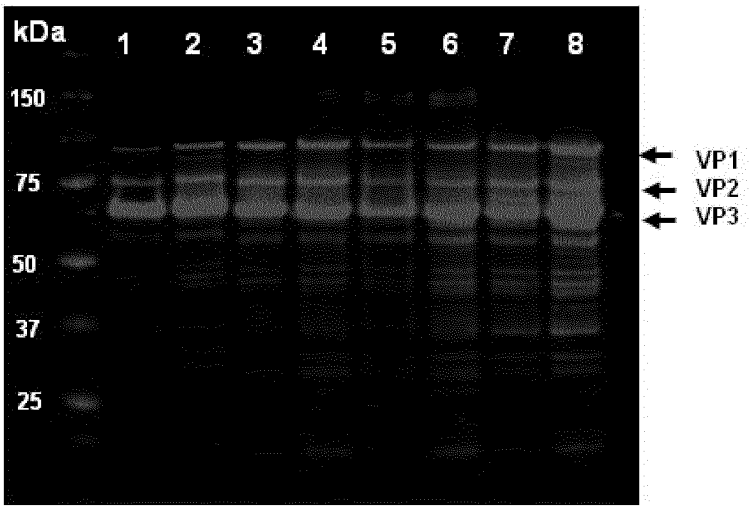

kDa
150
75
50
37
25
1
2
3
4
5
6
7
8
VP1
VP2
VP3

Figure 1

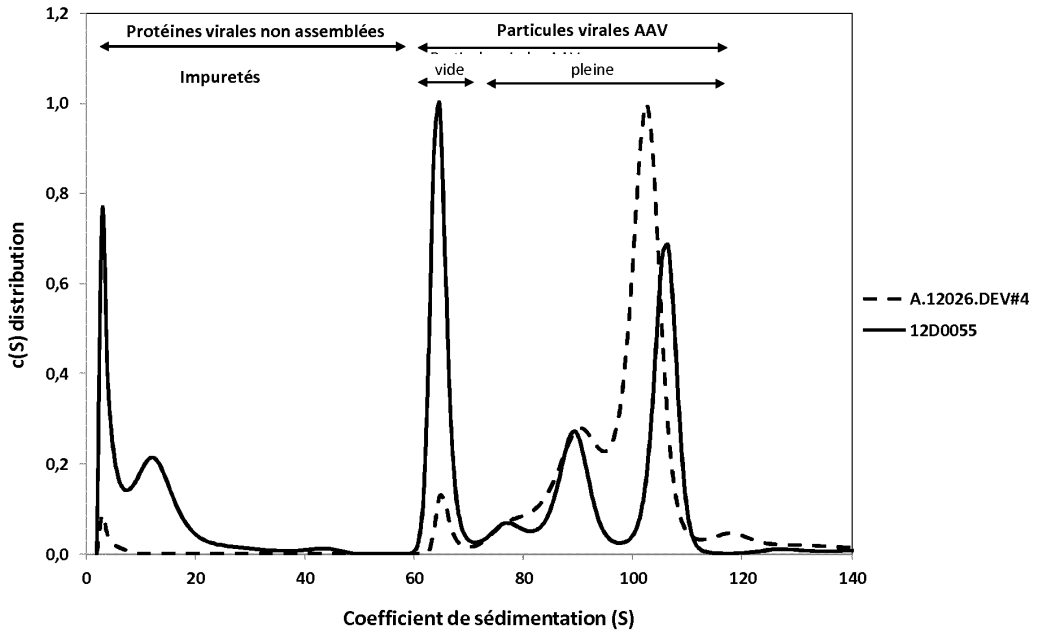


Figure 2

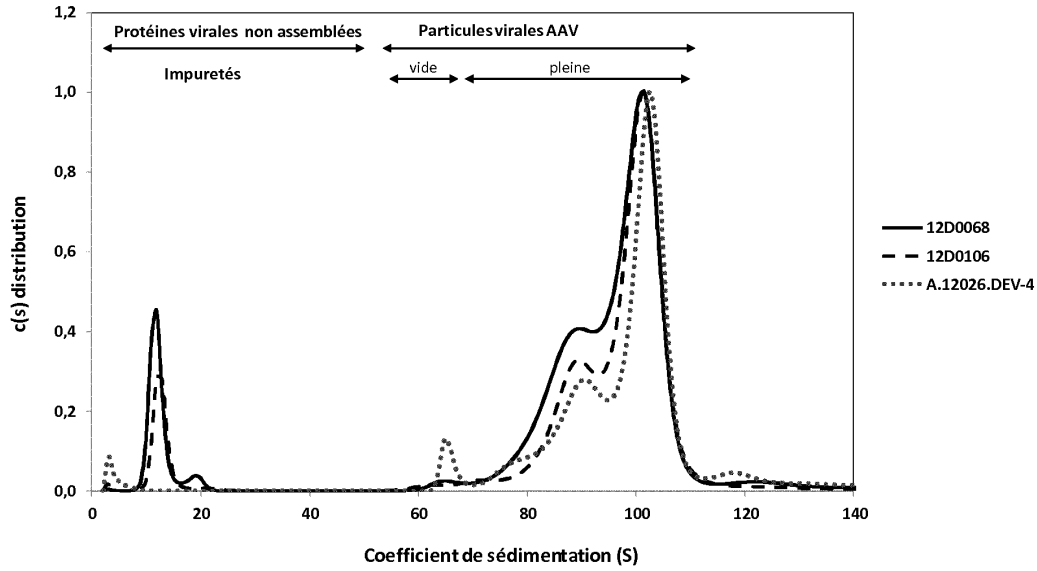


Figure 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/052978

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N7/02 C12N15/86 A61K48/00
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)
C12N A61K

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/122950 A1 (AMSTERDAM MOLECULAR THERAPEUTICS AMT IP B V [NL]; LUBELSKI JACEK [NL];) 6 October 2011 (2011-10-06)	1-6,10
Y	page 6 - page 10; claims 23-29, 42-44	7-9

Y	WO 2011/094198 A1 (PHILADELPHIA CHILDREN HOSPITAL [US]; WRIGHT JOHN FRASER [US]; QU GUANG) 4 August 2011 (2011-08-04) page 14 - page 17	7-9

A	WO 2011/012724 A1 (ASS INST DE MYOLOGIE [FR]; GENETHON [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR];) 3 February 2011 (2011-02-03) page 11	1-5

	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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	Date of mailing of the international search report
24 March 2014	03/04/2014

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

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/052978

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2007/084773 A2 (ASKLEPIO BIOPHARMACEUTICAL INC [US]; SAMULSKI RICHARD J [US]; CHEN HAI) 26 July 2007 (2007-07-26) claim 1 -----	1-4
A	TAMAS VIRAG ET AL: "Producing Recombinant Adeno-Associated Virus in Foster Cells: Overcoming Production Limitations Using a Baculovirus-Insect Cell Expression Strategy", HUMAN GENE THERAPY, vol. 20, no. 8, August 2009 (2009-08), pages 807-817, XP055052744, ISSN: 1043-0342, DOI: 10.1089/hum.2009.092 figures 1,4 -----	1-4
A	WO 2008/016391 A2 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR [US]; KAY MARK A [US]; GRIMM DIRK [US]) 7 February 2008 (2008-02-07) page 26 - page 37 -----	1-4

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2014/052978

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)			Publication date
WO 2011122950	A1	06-10-2011	NONE			
WO 2011094198	A1	04-08-2011	AU	2011209743	A1	23-08-2012
			CA	2787827	A1	04-08-2011
			CN	102947453	A	27-02-2013
			EP	2529020	A1	05-12-2012
			JP	2013517798	A	20-05-2013
			US	2013072548	A1	21-03-2013
			WO	2011094198	A1	04-08-2011
WO 2011012724	A1	03-02-2011	CA	2769745	A1	03-02-2011
			CN	102498213	A	13-06-2012
			EP	2287323	A1	23-02-2011
			EP	2459723	A1	06-06-2012
			US	2012141422	A1	07-06-2012
			WO	2011012724	A1	03-02-2011
WO 2007084773	A2	26-07-2007	EP	1981548	A2	22-10-2008
			US	2009191597	A1	30-07-2009
			WO	2007084773	A2	26-07-2007
WO 2008016391	A2	07-02-2008	EP	1979485	A2	15-10-2008
			US	2007253936	A1	01-11-2007
			WO	2008016391	A2	07-02-2008

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

Demande internationale n°
PCT/EP2014/052978

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Cadre N° I Séquence(s) de nucléotides ou d'acides aminés (suite du point 1.c de la première feuille)

1. En ce qui concerne la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale, le cas échéant, la recherche internationale a été effectuée sur la base des éléments suivants:

   a. (support)

   - [ ] sur papier
   - [X] sous forme électronique

   b. (moment)

   - [X] dans la demande internationale telle que déposée
   - [ ] avec la demande internationale, sous forme électronique
   - [ ] ultérieurement à la présente administration aux fins de la recherche

2. [ ] De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences ou d'un ou plusieurs tableaux y relatifs a été déposée, la déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles initialement fournies et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.

3. Commentaire complémentaires:

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2014/052978

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. C12N7/02 C12N15/86 A61K48/00
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2011/122950 A1 (AMSTERDAM MOLECULAR THERAPEUTICS AMT IP B V [NL]; LUBELSKI JACEK [NL];) 6 octobre 2011 (2011-10-06)	1-6,10
Y	page 6 - page 10; revendications 23-29, 42-44	7-9

Y	WO 2011/094198 A1 (PHILADELPHIA CHILDREN HOSPITAL [US]; WRIGHT JOHN FRASER [US]; QU GUANG) 4 août 2011 (2011-08-04) page 14 - page 17	7-9

A	WO 2011/012724 A1 (ASS INST DE MYOLOGIE [FR]; GENETHON [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR];) 3 février 2011 (2011-02-03) page 11	1-5

	-/--	

[X] Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

[X] Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
24 mars 2014	03/04/2014

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Deleu, Laurent

2

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (avril 2005)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2014/052978

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 2007/084773 A2 (ASKLEPIO BIOPHARMACEUTICAL INC [US]; SAMULSKI RICHARD J [US]; CHEN HAI) 26 juillet 2007 (2007-07-26) revendication 1	1-4
A	TAMAS VIRAG ET AL: "Producing Recombinant Adeno-Associated Virus in Foster Cells: Overcoming Production Limitations Using a Baculovirus-Insect Cell Expression Strategy", HUMAN GENE THERAPY, vol. 20, no. 8, août 2009 (2009-08), pages 807-817, XP055052744, ISSN: 1043-0342, DOI: 10.1089/hum.2009.092 figures 1,4	1-4
A	WO 2008/016391 A2 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR [US]; KAY MARK A [US]; GRIMM DIRK [US]) 7 février 2008 (2008-02-07) page 26 - page 37	1-4

2

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la deuxième feuille) (avril 2005)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/EP2014/052978

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)			Date de publication
WO 2011122950	A1	06-10-2011	AUCUN			
WO 2011094198	A1	04-08-2011	AU	2011209743	A1	23-08-2012
			CA	2787827	A1	04-08-2011
			CN	102947453	A	27-02-2013
			EP	2529020	A1	05-12-2012
			JP	2013517798	A	20-05-2013
			US	2013072548	A1	21-03-2013
			WO	2011094198	A1	04-08-2011
WO 2011012724	A1	03-02-2011	CA	2769745	A1	03-02-2011
			CN	102498213	A	13-06-2012
			EP	2287323	A1	23-02-2011
			EP	2459723	A1	06-06-2012
			US	2012141422	A1	07-06-2012
			WO	2011012724	A1	03-02-2011
WO 2007084773	A2	26-07-2007	EP	1981548	A2	22-10-2008
			US	2009191597	A1	30-07-2009
			WO	2007084773	A2	26-07-2007
WO 2008016391	A2	07-02-2008	EP	1979485	A2	15-10-2008
			US	2007253936	A1	01-11-2007
			WO	2008016391	A2	07-02-2008

I, Matthew John MCGAUGHEY BA, ATA,

translator to RWS Group Ltd, of Europa House, Chiltern Park, Chiltern Hill, Chalfont St Peter, Buckinghamshire, United Kingdom, declare as follows:

1. I am over 21 years of age and am competent to make this declaration.
2. I am a native speaker of English.
3. I am conversant in French.
4. I have 36 years of experience translating French to English.
5. I translated the attached document "WO2014125101A1" from French to English.
6. I certify that the attached translation of the document "WO2014125101A1" is, to the best of my knowledge and ability, a true and accurate translation from French to English.
7. In signing this declaration, I understand that the translation and this declaration may be filed as evidence in a contested case. I acknowledge that I may be subject to cross-examination.
8. I declare under penalty of perjury that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made herein on information and belief are believed to be true, and that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code.

Date: 13 March 2023

M. J. McGaughey

M. J. MCGAUGHEY

For and on behalf of RWS Group Ltd