



European Patent Office
80298 MUNICH
GERMANY



Lavoix
Bayerstrasse 83
80335 München
ALLEMAGNE

Questions about this communication ?
Contact Customer Services at www.epo.org/contact

Formalities officer
Donnelly, Pamela

Date
30.07.2020

Reference BET 17M2828	Application No./Patent No. 16703205.1 - 1118 / 3247793
Applicant/Proprietor Genzyme Corporation	

Communication pursuant to Rule 114(2) EPC

Please find enclosed observations by a third party concerning the patentability of the invention of the above-mentioned patent application. That person is not a party to the proceedings before the EPO (Art. 115 EPC).

Under Rule 114(2) EPC you may comment on the observations.

For the Examining Division



**Third Party Observation for application Number
EP20160703205**

Successful submission of observation took place on 23/07/2020
19:09

**Title: ANALYTICAL ULTRACENTRIFUGATION FOR CHARACTERIZATION OF
RECOMBINANT VIRAL PARTICLES**

Publication Number: EP3247793

Applicant: GENZYME CORP[US]

Date of publication: 29.11.2017

Date of filing: 19.01.2016

These observations have been filed by:

Anonymous

1. Facts and evidence

1.1. Reference is made to the following documents

PL1

Uploaded documents:

1. PL1_WO2014125101 A1.pdf

1.2. Observations concerning the public availability of the non-patent literature

NPL1

Uploaded documents:

1. NPL1_EP3247793 3POs final.pdf

2. Prior Use

2.1. Prior use (1)

When did the prior use occur?

What was made available?

Where was it made available?

How and to whom was it made available?

3. Common General Knowledge

4. Novelty (Article 54 EPC)

4.1. Novelty (1)

5. Inventive step (Article 56 EPC)

5.1. Inventive step (1)

Features known from the prior art:

Novel features not known from the prior art:

The technical effect caused or technical problems solved by the novel features:

Reasons why it would be obvious to the skilled persons to combine the features as set in the independent claim:

6. Any further Observations, e.g. Articles 52(2), 53, 57, 76, 83, 84, 123(2) EPC, validity of the priority date

6.1. Unallowable amendments (Articles 76 and 123 EPC)

6.2. Sufficiency of disclosure (Article 83 EPC)

6.3. Clarity (Article 84 EPC)

6.4. Further observations

OBJECTIONS TO THE PATENTABILITY OF EP160703205.1 (EP3247793)

EP3247793 teaches in paragraph [0087] that "AUC analysis has been well characterized over many decades and is highly versatile".

Claim amendments were filed on 12th March 2018, after issuance of the ISR, the IPRP having found all claims lacking an inventive step and that the "application is considered to constitute a disordered claiming of a wide variety of aspects of AUC viral particle analysis which is totally devoid of inventive subject matter."

The pending claims now comprise a single independent claim from which all subsequent claims depend.

Claim 1 is directed to:

1. A method of measuring the relative amount of capsid particles comprising variant recombinant viral genomes or empty viral capsid particles in a preparation of recombinant adeno-associated virus (AAV) particles comprising the steps of
 - a) subjecting the preparation to analytical ultracentrifugation under boundary sedimentation velocity conditions wherein the sedimentation of recombinant viral particles is monitored at time intervals,
 - b) plotting the differential sedimentation coefficient distribution value (C(s)) versus the sedimentation coefficient in Svedberg units (S),
 - c) integrating the area under each peak in the C(s) distribution to determine the relative concentration of each species of recombinant viral particles,
 - d) comparing the amount of recombinant AAV particles having an S value that do not correspond to recombinant AAV particles comprising intact viral genomes to the amount of recombinant AAV particles having an S value that corresponds to recombinant viral particles comprising intact AAV genomes or to the total amount of recombinant AAV particles in the preparation."

NOVELTY

WO 2014/125101 A1 is directed to methods for the production of double-stranded AAV viral particles using the insect/baculovirus system for the manufacture of sufficient amounts of product for therapeutic applications such as gene therapy. It describes the application of Analytical Ultracentrifugation (AUC) to preparations of recombinant adeno-associated viral particles to identify variant recombinant viral genomes or empty viral capsid particles with incredible sensitivity, precision and accuracy as shown in figures 2 and 3.

It discloses on page 11, 1st full para:

"d) Analysis of empty and full AAV viral particles: Analytical ultracentrifugation, wherein the sedimentation coefficient of the various AAV viral particles (empty, full, aggregate) and other populations present (subparticles, contaminating proteins, aggregate) in the purified product was determined by real time centrifugation. The centrifugation of the samples was carried out at a speed of 16,000 rpm using 100µl or 400µl of pure undiluted vector, the sedimentation was followed by absorbance at the wavelength of 276 nm, the sedimentation coefficient of the different populations was obtained using SEDFIT software."

As noted in [0094] of EP3247793 "One example of a suitable program for the determination of solute characteristics is the SEDFIT algorithm. In some embodiments the SEDFIT algorithm may be

OBJECTIONS TO THE PATENTABILITY OF EP160703205.1 (EP3247793)

used to calculate a differential coefficient distribution value, or C(s), using AUC data from a solution containing a mixture of particle species.”

Data analysis in WO 2014/125101 A1 is by SEDFIT, figures 2 and 3 show data analysis performed in exactly the same manner as in the present application with a C(s) v S plot.

The final paragraph of page 12 of WO 2014/125101 A1 describes:

*“ c) Analysis of empty and full AAV particles. It has been described in the literature that the density is approximately 1.32 g / cm³ (equivalent to 60S) for empty AAV viral particles, that is vectors lacking the viral genome and 1.45 g / cm³ (equivalent to 110S) for full AAV viral particles, that is to say those containing a viral genome with a maximum size of 4800 bases. **Knowing that the difference in density is significant enough to distinguish them by centrifugation**, we have now implemented a method to analytically separate by ultracentrifugation **and quantify the different species** present in an AAV viral preparation”* (emphasis added).

Thus WO2014/125101 A1 discloses:

A method of measuring the relative amount of capsid particles comprising variant recombinant viral genomes or empty viral capsid particles in a preparation of recombinant adeno-associated virus (AAV) particles, [Analytical ultracentrifugation, wherein the sedimentation coefficient of the various AAV viral particles (empty, full, aggregate) and other populations present (subparticles, contaminating proteins, aggregate) in the purified product was determined by real time centrifugation].

comprising the steps of:

- a) subjecting the preparation to analytical ultracentrifugation under boundary sedimentation velocity conditions wherein the sedimentation of recombinant viral particles is monitored at time intervals, [Analytical ultracentrifugation, wherein the sedimentation coefficient of the various AAV viral particles (empty, full, aggregate) and other populations present (subparticles, contaminating proteins, aggregate) in the purified product was determined by real time centrifugation, the sedimentation was followed by absorbance at the wavelength of 276 nm]
- b) plotting the differential sedimentation coefficient distribution value (C(s)) versus the sedimentation coefficient in Svedberg units (S), [figures 2 and 3]
- c) integrating the area under each peak in the C(s) distribution to determine the relative concentration of each species of recombinant viral particles, [quantifying the different species]
- d) comparing the amount of recombinant AAV particles having an S value that do not correspond to recombinant AAV particles comprising intact viral genomes to the amount of recombinant AAV particles having an S value that corresponds to recombinant viral particles comprising intact AAV genomes or to the total amount of recombinant AAV particles in the preparation.” [comparing the size of the different species peaks in figures 2 or 3 which is an inevitable consequence of viewing figure 2 or 3]

Hence WO2014/125101 A1 denies new claim 1 novelty.

OBJECTIONS TO THE PATENTABILITY OF EP160703205.1 (EP3247793)

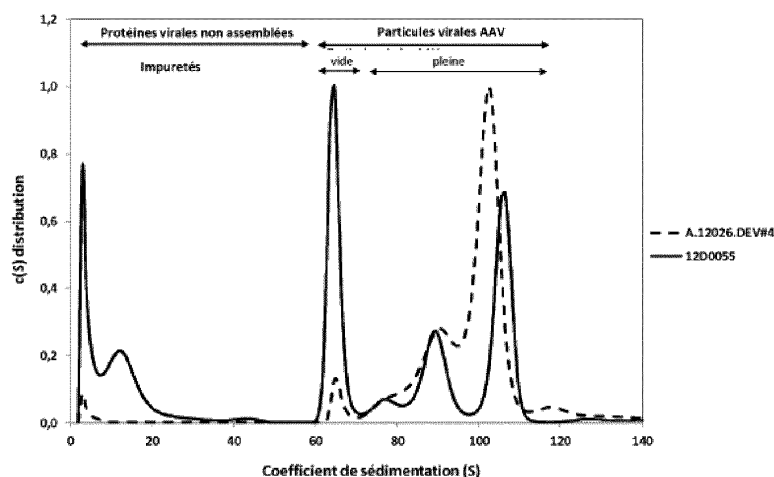


Figure 2

FIG. 2 is A graph showing the distribution profile in analytical ultracentrifugation of the batch of scAAV9 n° A12026 DEV # 4 produced with the system sf9 (dotted line) and batch 12D0055 produced with the HEK293 system (in solid line).

INVENTIVE STEP

In the examination report of 23/1/2020 the Examiner finds that the “application is totally devoid of inventive subject-matter ... Hence, the question is merely whether a skilled person would consider applying the claimed methods to AAV.”

As WO 2014/125101 A1 teaches the use of these methods in AAV viral preparations the present application cannot possibly be inventive.

In the response of 25/5/2020 the Applicant reiterates the argument first made on 12/03/2018 that “a person of skill in the art would not have had a reasonable expectation that using AUC as claimed to measure the relative amount of capsid particles comprising variant recombinant viral genomes or empty viral capsid particles in a preparation of recombinant adeno-associated virus (AAV) particles would work.”

WO 2014/125101 A1 demonstrates the inaccuracy of this assertion.

We note that in paragraph 1.2 of the examination report of 23/1/2020 the Examiner finds that “the differences to the prior art are essentially only explicit listings of obvious features not specifically addressed but obviously within the realms of the disclosures of the prior art. These differences do not establish inventive activity. The fact that the method can achieve all that is claimed is thus immediately obvious to a skilled person viewing the prior art.”

If, the Examiner is not persuaded by any of the above arguments with respect to WO 2014/125101 A1, and instead favours adherence to the findings of the examination report of 23/1/2020 (which reiterated paragraph 1.1 of the IPRP) namely that either D1 or D2 is deemed to be the closest prior art and the common problem is “the provision of a method for the qualitative/quantitative assessment of particle heterogeneity (at aggregate or genome level) in AAV viral preparations”; then the present application clearly lacks an inventive step over the teachings of D1, or D2 in combination with WO 2014/125101 A1.

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

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



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

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

WIPO | PCT

(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 & Associates, 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))



WO 2014/125101 A1

(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.

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 capsid 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'hémophilie⁶. 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 capsid 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 capsid produites sont des protéines de capsid 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 ou 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 capsid 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 capsid 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 capsid 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 capsid 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 virales⁶.

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 $0,01 \cdot 10^6$ et $5 \cdot 10^6$ cellules/mL, en particulier à une densité cellulaire comprise entre $0,8 \cdot 10^6$ et $2 \cdot 10^6$ 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 μ m). 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 μ m.

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 issu 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 $0,8 \cdot 10^6$ à $2 \cdot 10^6$ 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'-CTCCATCACTAGGGGTTCTTG-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'éluat 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 technologies 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 ($5 \cdot 10^9$ 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 ($5 \cdot 10^9$ 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 100 µl 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 cliniques¹⁴. 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 bases¹⁵. 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	12D0055	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

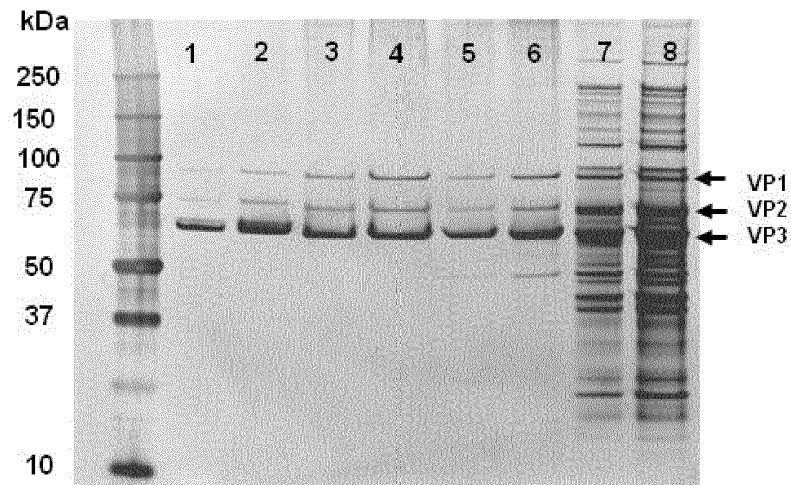
mode capture, un passage sur une résine anionique en mode négatif et un passage sur une autre résine anionique en mode capture.

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.

1/2

A



B

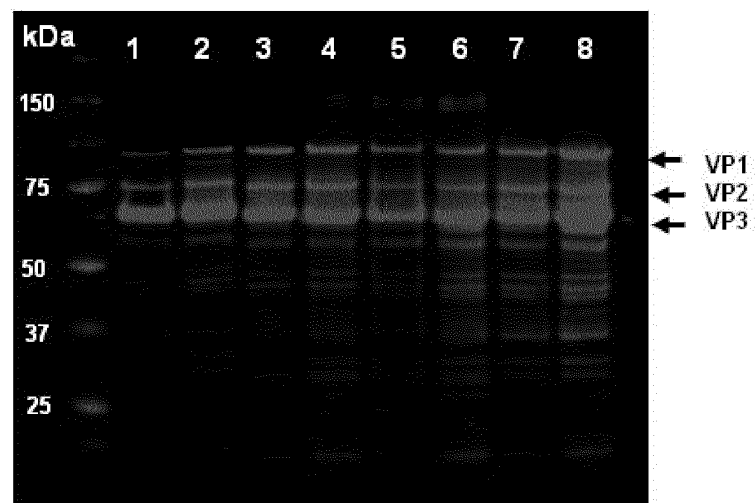


Figure 1

2/2

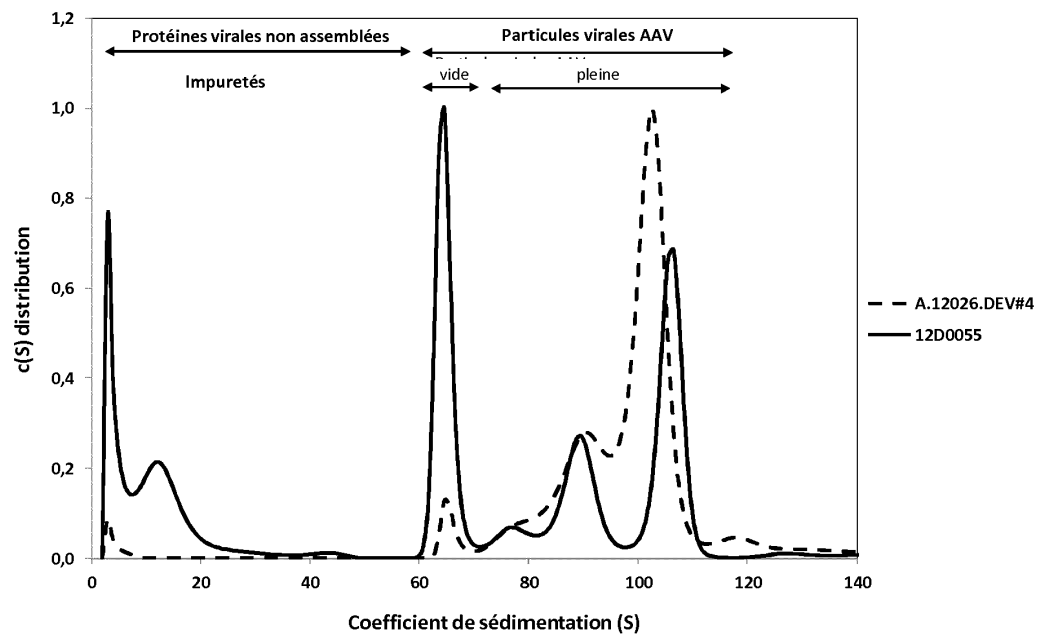


Figure 2

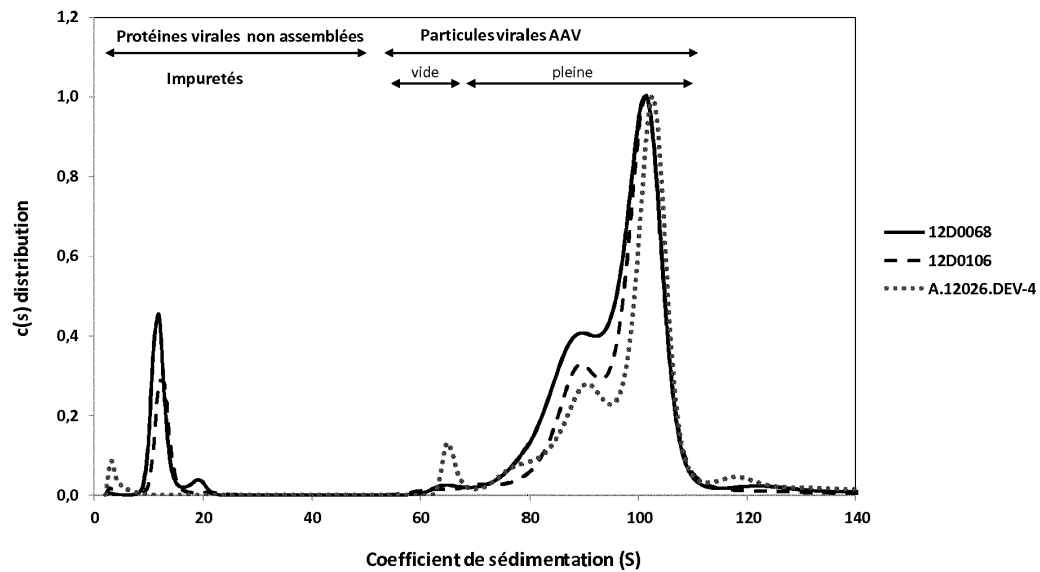


Figure 3

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)	7-9
A	page 14 - page 17 ----- WO 2011/012724 A1 (ASS INST DE MYOLOGIE [FR]; GENETHON [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR];) 3 February 2011 (2011-02-03)	1-5
	page 11 ----- -/-	

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

☒ 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

24 March 2014

Date of mailing of the international search report

03/04/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Deleu, Laurent

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

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)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2014/052978

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
☒ sous forme électronique
 - b. (moment)
☒ 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 listing 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)	7-9
A	page 14 - page 17 ----- WO 2011/012724 A1 (ASS INST DE MYOLOGIE [FR]; GENETHON [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR];) 3 février 2011 (2011-02-03)	1-5
	page 11 ----- -/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ 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

24 mars 2014

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

03/04/2014

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Deleu, Laurent

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

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 CA 2787827 A1 CN 102947453 A EP 2529020 A1 JP 2013517798 A US 2013072548 A1 WO 2011094198 A1	23-08-2012 04-08-2011 27-02-2013 05-12-2012 20-05-2013 21-03-2013 04-08-2011
WO 2011012724 A1	03-02-2011	CA 2769745 A1 CN 102498213 A EP 2287323 A1 EP 2459723 A1 US 2012141422 A1 WO 2011012724 A1	03-02-2011 13-06-2012 23-02-2011 06-06-2012 07-06-2012 03-02-2011
WO 2007084773 A2	26-07-2007	EP 1981548 A2 US 2009191597 A1 WO 2007084773 A2	22-10-2008 30-07-2009 26-07-2007
WO 2008016391 A2	07-02-2008	EP 1979485 A2 US 2007253936 A1 WO 2008016391 A2	15-10-2008 01-11-2007 07-02-2008

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (avril 2005)