

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 972 859**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/861** (2006.01)

**C12N 7/00** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**C07K 2/00** (2006.01)

**C12N 15/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.07.2017 PCT/US2017/043291**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.01.2018 WO18017956**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2017 E 17831956 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2023 EP 3488007**

54 Título: **Métodos de recuperación elevada escalables para producir un vector vírico adenoasociado recombinante (rAAV) de rendimiento elevado y vectores víricos adenoasociados recombinantes (rAAV) así producidos**

30 Prioridad:

**21.07.2016 US 201662365312 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.06.2024**

73 Titular/es:

**SPARK THERAPEUTICS, INC. (100.0%)  
3737 Market Street, Suite 1300  
Philadelphia, Pennsylvania 19104, US**

72 Inventor/es:

**QU, GUANG;  
WRIGHT, JOHN FRASER;  
OH, YOUNGHOON;  
WANG, YUHUAN;  
ZHANG, HAIBO y  
DUNCAN, LAURA**

74 Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

ES 2 972 859 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Métodos de recuperación elevada escalables para producir un vector vírico adenoasociado recombinante (rAAV) de rendimiento elevado y vectores víricos adenoasociados recombinantes (rAAV) así producidos

## Introducción

La filtración de flujo tangencial (TFF) es una técnica utilizada en la industria biotecnológica para concentrar los productos mediante un procedimiento de ultrafiltración (UF) y para el intercambio de amortiguador mediante diafiltración (DF) para formular los productos. Sin embargo, cuando la TFF se utiliza para llevar a cabo la UF/DF para vectores víricos adenoasociados recombinantes (rAAV), en el procedimiento se pierden cantidades significativas de vectores rAAV. Cuando los vectores rAAV están muy concentrados, incluso se perderán más vectores. La cantidad de vector perdida en el procedimiento de UF/DF hace casi imposible obtener preparaciones de vectores rAAV de alta concentración, lo que es muy deseable en el desarrollo de productos de terapia génica relacionada con rAAV.

El otro fenómeno observado en la fabricación de vectores rAAV es que los vectores rAAV tienden a agregarse en el procedimiento de UF/DF, particularmente cuando las preparaciones de vectores están muy concentradas, tales como  $1E+13$  vg por ml ( $1 \times 10^{13}$  genomas vectoriales/ml; vg: genoma vectorial) o más. La agregación de los vectores rAAV parece depender del título: cuanto mayor es el título, mayor es la agregación del vector. La agregación de los vectores asimismo da como resultado la pérdida de vectores durante la fabricación. Además, los vectores agregados son un problema para la seguridad de los pacientes cuando se usan en clínicas.

Los problemas con la agregación de los vectores rAAV y la pérdida de vectores en el procedimiento de UF/DF usando técnicas de TFF descritos anteriormente representan retos significativos de procedimiento en la fabricación y/o purificación de vectores rAAV. La invención en la presente memoria aborda estos problemas.

## Sumario

De muchas hipótesis diferentes, la agregación de vectores rAAV y la pérdida de vectores en el procedimiento de UF/DF usando técnicas de TFF pueden depender del procedimiento y de la formulación. Sobre la base de tales hipótesis, se diseñaron nuevas formulaciones y se crearon nuevos parámetros operativos para el procedimiento de UF/DF para mejorar la recuperación de los vectores y reducir, minimizar o evitar que el vector rAAV se agregue. En las formulaciones y/o parámetros operativos de la invención para el procedimiento de UF/DF, la recuperación de vectores rAAV mejoró, y se redujo la agregación de los vectores rAAV. Los datos descritos en la presente memoria muestran que los nuevos formulaciones y parámetros operativos creados para el procedimiento de UF/DF, solos o en combinación, proporcionan un aumento significativo en el vector rAAV global recuperado de la preparación inicial del vector rAAV. De hecho, los vectores rAAV se pueden concentrar hasta  $5E+13$  vg/ml ( $5 \times 10^{13}$  genomas vectoriales/ml) sin pérdida significativa de vector, y los vectores son predominantemente monómeros, indicando reducciones en la agregación.

Las formulaciones y/o los parámetros operativos de la invención descritos en la presente memoria permitirán la concentración de vectores rAAV hasta una concentración elevada, por ejemplo hasta  $5E+13$  ( $5 \times 10^{13}$ ) genomas vectoriales por mililitro (vg/ml) con pocos agregados de rAAV, si existen. Además, las formulaciones y/o parámetros operativos de la invención descritos en la presente memoria mejorarán la recuperación de vectores rAAV del intercambio de amortiguador, o concentrarán los vectores usando técnicas de filtración de flujo tangencial (TFF). Las formulaciones y/o los parámetros de la invención operativos descritos en la presente memoria pueden favorecer cualquier aplicación clínica de terapia génica que utilice vectores rAAV, tal como la terapia génica mediada por rAAV para enfermedades de almacenamiento lisosomal, tal como la lipofuscinosis neuronal ceroida 2 (CLN2), la terapia génica mediada por rAAV para deficiencias de la coagulación sanguínea (hemofilia A y hemofilia B), etc., cuando se desea una concentración elevada de preparaciones de rAAV. La recuperación mejorada de vectores a través del procedimiento de ultrafiltración (UF) y diafiltración (DF) utilizando TFF asimismo reducirá los costes de los bienes de fabricación de vectores rAAV, y asimismo proporcionará vectores o aplicaciones clínicas de rAAV más robustos y consistentes.

En consecuencia, la invención proporciona diversos beneficios al procedimiento de fabricación de rAAV. En una forma de realización, la recuperación de vectores rAAV es mejorada, y puede mejorarse significativamente, proporcionando de ese modo un rendimiento mejorado de principio a fin (por ejemplo, rendimiento de vectores rAAV de 70 % o más de principio a fin). En otra forma de realización, la agregación de rAAV se reduce, se minimiza o se evita, particularmente cuando el vector rAAV se concentra hasta títulos elevados del vector rAAV. En una forma de realización adicional, el vector rAAV se produce en concentración elevada (por ejemplo, por lo menos a  $1E+12$ ,  $5E+12$ ,  $1E+13$ , o  $5E+13$  vg/ml), adecuada para aplicaciones clínicas en las que se desea un título elevado y/o un volumen pequeño de administración (por ejemplo, inyección o infusión) del vector rAAV. En unas formas de realización adicionales, la invención proporciona uno o más de los siguientes, solos, o en cualquier combinación entre sí, o en cualquier combinación con las otras formas de realización descritas en la presente memoria:

- (1) un procedimiento de UF/DF muy fiable/consistente para fabricar vectores rAAV, que puede reducir los riesgos de fabricación basados en la variabilidad operativa;
- (2) una recuperación eficiente de vectores rAAV a partir del procedimiento de UF/DF, lo que proporciona un aumento global en el rendimiento de vectores rAAV (por ejemplo, 70 % o más de principio a fin);
- (3) se evita una pérdida significativa de vectores rAAV;
- (4) se reduce, minimiza o evita la agregación de vectores rAAV (por ejemplo, agregación de vectores rAAV no detectable mediante técnicas tales como cromatografía de exclusión por tamaños y/o dispersión dinámica de la luz);
- (5) se permite una concentración del vector rAAV hasta una concentración elevada, por ejemplo,  $5E+13$  vg/ml, con agregación reducida, minimizada o poca o ninguna del vector rAAV (mediante técnicas tales como cromatografía de exclusión por tamaños y/o dispersión dinámica de la luz); y/o
- (6) se proporcionan preparaciones de vectores rAAV de títulos elevados, para permitir la administración de pequeños volúmenes en aplicaciones clínicas.

## Descripción de los dibujos

La figura 1 representa cómo un aumento de la velocidad de cizallamiento durante el procedimiento de TFF mejoró significativamente la recuperación del vector rAAV. Los vectores AAV2-hTPP1v1 ( $2.5E+14$  vg) de postultracentrifugación con CsCl se diluyeron inicialmente hasta 50 ml ( $5.0E+12$  vg/ml) usando un amortiguador de diafiltración. Para un ciclo de diafiltración, se añadieron 25 ml de amortiguador de diafiltración en los 50 ml de vectores diluidos, y después se inició la diafiltración hasta que el volumen disminuyó hasta 50 ml. La etapa de diafiltración se repitió 24 veces. Los vectores se ultrafiltraron hasta 5 ml tras los 25 ciclos del procedimiento de diafiltración. Los 5 ml de vectores se recogieron para los ensayos. (A) El análisis qPCR mostró que el título del vector fue  $4.81E+13$  vg/ml cuando se utilizó una mayor velocidad de cizallamiento ( $\sim 10,000$  s<sup>-1</sup>) durante el procedimiento de TFF, sugiriendo una recuperación de más del 90 % del vector; mientras que se logró  $1.38E+13$  vg/ml a una velocidad de cizallamiento baja ( $\sim 3000$  s<sup>-1</sup>), que representa una recuperación de aproximadamente 30 % del vector. (B) El análisis de dispersión dinámica de la luz (DLS) mostró que los diámetros de los vectores de la velocidad de cizallamiento más alta ( $\sim 10,000$  s<sup>-1</sup>) o de la velocidad de cizallamiento baja ( $\sim 3000$  s<sup>-1</sup>) fueron similares.

La figura 2 representa cómo la presión transmembranaria (TMP) afecta la recuperación de rAAV del procedimiento de TFF. Se diluyeron los vectores AAV2-hTPP1v1 ( $2.5E+14$  vg) de postultracentrifugación con CsCl hasta 50 ml ( $5.0E+12$  vg/ml) usando amortiguador de diafiltración, y se inició el procedimiento de DF; para cada ciclo de diafiltración, se añadieron 25 ml de amortiguador de diafiltración en los 50 ml de vectores diluidos, y el volumen se redujo hasta 50 ml. La etapa de diafiltración se llevó a cabo 25 veces para lograr un intercambio de amortiguador suficiente. Los vectores se ultrafiltraron entonces hasta 5 ml. El análisis de Q-PCR (A) mostró que el título del vector fue  $3.43E+13$  vg/ml cuando se utilizó una TMP ( $\sim 10.5$  psig), y el título fue  $2.90E+13$  vg/ml en una TMP mayor ( $\sim 15.5$  psig). El análisis de DLS mostró que los diámetros de las preparaciones de vectores son 29.07 nm y 38,2 nm para la TMP baja ( $\sim 10$  psig) y TMP relativamente alta ( $\sim 15.5$  psig), respectivamente. El diámetro más grande representa vectores rAAV más agregados en la preparación.

La figura 3 representa unos datos que indican que la recolección de vectores sin circulación tras el procedimiento de UF/DF evita la recuperación de partículas de rAAV agregadas en la preparación del vector. Los vectores AAV2-hTPP1v1 ( $2.5E+14$  vg) de postultracentrifugación con CsCl se diluyeron hasta 50 ml ( $5.0E+12$  vg/ml) utilizando amortiguador de diafiltración, y se sometieron a un procedimiento de UF/DF. Los vectores se recogieron drenando directamente los vectores concentrados (expulsión), o drenando los vectores concentrados después de varios minutos de circulación (circulación), con un caudal menor que UF/DF. El análisis de Q-PCR (A) mostró que los títulos de los vectores fueron similares con dos métodos diferentes de recuperación de vectores. Sin embargo, el análisis de DLS (B) mostró que el diámetro de los vectores fue significativamente más grande en la preparación de circulación, sugiriendo vectores rAAV más agregados.

La figura 4 representa unos datos que indican que la dilución del vector de bajo título ( $\sim 5E+12$  vg/ml) redujo sustancialmente la agregación del vector mediante el procedimiento de UF/DF. Los vectores AAV2-hTPP1v1 ( $2.5E+14$  vg) de postultracentrifugación con CsCl se diafiltraron directamente, o primero se diluyeron utilizando amortiguador de diafiltración y después se diafiltraron durante 25 ciclos. Ambos vectores diafiltrados se ultrafiltraron hasta 5 ml tras el procedimiento de diafiltración. El análisis de DLS mostró que el diámetro de los vectores (barra izquierda) recuperados del procedimiento de diafiltración sin dilución fue significativamente mayor que el de los vectores (barra derecha) con dilución.

La figura 5 representa unos datos que indican que Pluronic F-68 reduce, minimiza o evita que los vectores rAAV formen partículas más grandes (es decir, agregados). Las partículas vacías de AAV2-hTPP1v1 de la

postultracentrifugación con CsCl, como partículas víricas modelo, se diluyeron inicialmente con amortiguador de diafiltración que contiene pluronic F-68 (denominado amortiguador 1) o sin pluronic F-68 (denominado amortiguador 2). Las partículas vacías diluidas se diafiltraron entonces durante 25 ciclos con el amortiguador 1 de diafiltración o el amortiguador 2 para cada ciclo. Las partículas vacías se ultrafiltraron hasta 5 ml tras el procedimiento de diafiltración. Los 5 ml de partículas vacías se recogieron para ensayos. (A) El análisis de DLS mostró que el recuento medio (kcps) de partículas vacías con pluronic F-68 (barra derecha) fue significativamente mayor que aquel sin pluronic F-68 (barra izquierda), lo que sugiere que se logró una mejor recuperación en presencia de pluronic F-68. (B) El diámetro de partículas vacías sin pluronic F-68 (barra izquierda) fue mayor que el de las partículas vacías con pluronic F-68 (barra derecha).

### Descripción detallada

La filtración de flujo tangencial es una técnica ampliamente utilizada para el intercambio de amortiguador (diafiltración, DF) y para concentrar (ultrafiltración, UF) bioproductos. Sin embargo, cuando la técnica de TFF se usó para el intercambio de amortiguador de vectores rAAV y para la formulación final, se encontró que se perdió una cantidad significativa de vectores en el procedimiento de UF/DF. El título/concentración elevados del vector rAAV es necesario a menudo para tratar ciertas enfermedades humanas. Sin embargo, la formulación y los parámetros operativos actuales para UF/DF no podrían producir un vector rAAV a la concentración deseada, tal como un título de vector de  $1E+13$  vg/ml o mayor. Además, los vectores rAAV tienden a agregarse cuando se concentran a nivel de  $1E+13$  vg/ml o más.

A fin de superar estas limitaciones técnicas sustanciales para fabricar vectores rAAV de títulos elevados, en esta invención se creó una nueva formulación para el procedimiento de TFF de vectores rAAV. Además, en esta invención se crearon nuevos parámetros operativos para el procedimiento de TFF. Cuando se utilizó la formulación recientemente desarrollada en el procedimiento de TFF recientemente creado (con los parámetros recientemente desarrollados) para llevar a cabo el procedimiento de UF/DF final para formular las preparaciones de vectores rAAV, se encontró que la recuperación de vectores rAAV mejora significativamente, y los vectores rAAV permanecen como monómeros. En particular, con la nueva formulación de TFF, en combinación con la nueva técnica operativa de TFF, los vectores rAAV se concentraron sin agregación sustancial de los vectores rAAV, incluso cuando se concentraron hasta  $5E+13$  vg/ml. Además, la recuperación de vectores rAAV (rendimiento global) mejoró significativamente.

Esta invención proporciona una solución para poder concentrar productos de vectores rAAV hasta una concentración elevada sin agregación detectable de los vectores rAAV, hasta  $5E+13$  vg/ml sin agregación de rAAV detectable. Esta invención asimismo proporciona una solución para llevar a cabo el procedimiento de UF/DF usando técnicas de TFF para el vector rAAV sin perder una cantidad significativa de vector, por ejemplo el vector rAAV recuperado del procedimiento de UF/DF se encuentra en los intervalos de 70 % hasta 95 %, de principio a fin. Esta invención permitió la TFF como una técnica eficaz para el procedimiento de fabricación de rAAV, particularmente cuando se van a fabricar vectores rAAV concentrados.

El término "vector" se refiere a una pequeña molécula de ácido nucleico portadora, un plásmido, virus (por ejemplo, vector AAV), u otro vehículo que se puede manipular mediante inserción o incorporación de un ácido nucleico. Tales vectores se pueden usar para manipulación genética (es decir, "vectores de clonación"), para introducir/transferir polinucleótidos en células, y para transcribir o traducir el polinucleótido insertado en células. Un "vector de expresión" es un vector especializado que contiene un gen o una secuencia de ácido nucleico con las regiones reguladoras necesarias para la expresión en una célula hospedante. Una secuencia de ácido nucleico del vector generalmente contiene por lo menos un origen de replicación para la propagación en una célula, y opcionalmente elementos adicionales, tales como un transgén, un elemento de control de la expresión (por ejemplo, un promotor, potenciador), intrón, ITR(s), señal de poliadenilación.

Un vector vírico deriva de o se basa en uno o más elementos de ácido nucleico que comprenden un genoma vírico. Los vectores víricos particulares incluyen vectores de virus adenoasociados (AAV).

El término "recombinante", como modificador de vector, tal como vectores víricos recombinantes, por ejemplo parvovirus (por ejemplo, rAAV), así como un modificador de secuencias tales como polinucleótidos y polipéptidos recombinantes, significa que las composiciones se han manipulado (es decir, modificado genéticamente) de una manera que generalmente no se produce en la naturaleza. Un ejemplo particular de un vector recombinante, tal como un vector rAAV, sería aquel en el que se inserta en el genoma vírico un polinucleótido que normalmente no está presente en el genoma vírico de tipo salvaje (por ejemplo, AAV). Aunque el término "recombinante" no siempre se usa en la presente memoria con referencia a vectores, tales como vectores AAV, así como a secuencias tales como polinucleótidos, las formas recombinantes están expresamente incluidas a pesar de cualquier omisión.

Un "vector" vírico recombinante o "vector rAAV" deriva del genoma de tipo salvaje de un virus, tal como AAV, usando métodos moleculares para eliminar el genoma de tipo salvaje del virus (por ejemplo, AAV), y sustituyéndolo por un ácido nucleico no nativo. Típicamente, para AAV, una o ambas secuencias de repetición terminal invertida (ITR) del genoma del AAV están retenidas en el vector rAAV. Un vector vírico "recombinante" (por ejemplo, rAAV)

se distingue de un genoma vírico (por ejemplo, AAV), puesto que todo o parte del genoma vírico se ha sustituido por una secuencia no nativa con respecto al ácido nucleico genómico vírico (por ejemplo, AAV). Por lo tanto, la incorporación de una secuencia no nativa define al vector vírico (por ejemplo, AAV) como un vector "recombinante", que en el caso de AAV se puede denominar como un "vector rAAV".

Un vector recombinante se puede empaquetar - al que se hace referencia en la presente memoria como una "partícula", para la infección (transducción) subsiguiente de una célula, *ex vivo*, *in vitro* o *in vivo*. Cuando una secuencia de vector recombinante está encapsidada o empaquetada en una partícula de AAV, la partícula asimismo se puede denominar "rAAV". Tales partículas incluyen proteínas que encapsidan o empaquetan el genoma del vector. Los ejemplos particulares incluyen proteínas de la cubierta vírica, y en el caso de AAV, proteínas de la cápside.

Un "genoma" vectorial, o abreviado convenientemente como "vg", se refiere a la porción de la secuencia del plásmido recombinante que finalmente se empaqueta o encapsida para formar una partícula viral (por ejemplo, rAAV). En los casos en los que se usan plásmidos recombinantes para construir o fabricar vectores recombinantes, el genoma vectorial no incluye la porción del "plásmido" que no corresponde a la secuencia del genoma vectorial del plásmido recombinante. Esta porción no del genoma vectorial del plásmido recombinante se denomina "esqueleto del plásmido", que es importante para la clonación y amplificación del plásmido, un proceso que es necesario para la propagación y producción de vectores AAV recombinantes, pero que en sí misma no está empaquetada o encapsidada en partículas del virus (por ejemplo, AAV). De este modo, un "genoma" vectorial se refiere al ácido nucleico que está empaquetado o encapsidado por el virus (por ejemplo, AAV).

Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan en la presente memoria de forma intercambiable para referirse a todas las formas de ácido nucleico, oligonucleótidos, incluyendo ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN). Los polinucleótidos incluyen ADN genómico, ADNc y ADN antisentido, y ARNm ajustado o no ajustado, ARNr, ARNt, y ADN o ARN inhibidor (ARNi, por ejemplo ARN pequeño o corto de horquilla (hc), microARN (miARN), ARN interferente pequeño o corto (ic), ARN de ajuste en trans, o ARN antisentido). Los polinucleótidos incluyen polinucleótidos de origen natural, sintéticos, e intencionalmente modificados o alterados (por ejemplo, ácido nucleico variante). Los polinucleótidos pueden ser individuales, dobles, o triples, lineales o circulares, y pueden tener cualquier longitud. Al analizar los polinucleótidos, una secuencia o estructura de un polinucleótido particular se puede describir en la presente memoria según la convención de proporcionar la secuencia en la dirección 5' a 3'.

Un "transgén" se usa en la presente memoria para referirse convenientemente a un polinucleótido o un ácido nucleico que se pretende introducir o se ha introducido en una célula u organismo. Los transgenes incluyen cualquier ácido nucleico, tal como un gen que codifica un polipéptido o proteína.

Los "polipéptidos", "proteínas" y "péptidos" codificados por el "ácido nucleico" o "secuencias polinucleotídicas" o "transgenes" incluyen secuencias nativas de longitud completa, así como proteínas de tipo salvaje de origen natural, así como subsecuencias funcionales, formas modificadas o variantes de secuencia, en tanto que la subsecuencia, la forma modificada o la variante retengan en cierto grado la funcionalidad de la proteína nativa de longitud completa. Tales polipéptidos, proteínas y péptidos codificados por las secuencias de ácido nucleico pueden ser, pero no es necesario, idénticas a la proteína endógena que es defectuosa, o cuya expresión es insuficiente o deficiente en el mamífero tratado.

El vector AAV recombinante incluye cualquier cepa o serotipo vírico. Como ejemplo no limitativo, un vector rAAV se puede basar en cualquier genoma de AAV o cápside de AAV, tales como AAV-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -rh74, -rh10 o AAV-2i8, por ejemplo. Tales vectores se pueden basar en la misma cepa o serotipo (o subgrupo o variante), o pueden ser diferentes entre sí. Como ejemplo no limitativo, un vector AAV recombinante basado en un genoma de serotipo puede ser idéntico a una o más de las ITR o proteínas de la cápside que empaquetan el vector. Además, un genoma de vector AAV recombinante se puede basar en un genoma de serotipo de AAV (por ejemplo, AAV2) distinto de una o más de las ITR o proteínas de la cápside de AAV que empaquetan el vector. Por ejemplo, el genoma del vector AAV se puede basar en AAV2, mientras que por lo menos una de las tres proteínas de la cápside podría ser un AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 o AAV-2i8, o sus variantes, por ejemplo.

En unas formas de realización particulares, los vectores rAAV incluyen AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 y AAV-2i8, así como variantes (por ejemplo, variantes de ITR y de la cápside), tales como inserciones, adiciones, sustituciones y eliminaciones de aminoácidos) de los mismos, por ejemplo como se expone en los documentos WO 2013/158879 (solicitud internacional PCT/US2013/037170), WO 2015/013313 (solicitud internacional PCT/US2014/047670) y US 2013/0059732 (solicitud US nº 13/594,773, que describe LK01, LK02, LK03, etc.).

Las variantes de AAV incluyen variantes y quimeras de las ITR y cápsides de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 y AAV-2i8. En consecuencia, se incluyen vectores AAV y variantes AAV (por ejemplo, variantes de ITR y de la cápside).

5 En diversas formas de realización ejemplificativas, un vector AAV relacionado con un serotipo de referencia presenta un polinucleótido (por ejemplo, ITR) o polipéptido (por ejemplo, cápside) que incluye o consiste en una secuencia por lo menos 80 % o más (por ejemplo, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99.1 %, 99.2 %, 99.3 %, 99.4 %, 99.5 %, etc.) idéntica a uno o más AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 o AAV-2i8 (por ejemplo, tal como una secuencia de ITR, o una secuencia de VP1, VP2, y/o VP3).

10 Como se utiliza en la presente memoria, la frase "vector AAV auténtico" o "vector rAAV auténtico" se refiere a vectores AAV que comprenden un transgén de interés que son capaces de infectar células diana. La frase excluye vectores AAV vacíos (no está presente el transgén), y vectores AAV que carecen de insertos completos (por ejemplo, fragmentos de transgén), o aquellos vectores AAV que contienen ácidos nucleicos de la célula hospedante.

15 El término "aislado", cuando se usa como un modificador de una composición, significa que las composiciones se obtienen por la mano del hombre, y/o se separan, completamente o por lo menos en parte, de su ambiente *in vivo* natural. En general, las composiciones aisladas están sustancialmente libres de uno o más materiales con los que se asocian normalmente en la naturaleza, por ejemplo una o más proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, hidratos de carbono, membranas celulares. Por ejemplo, un "ácido nucleico aislado" puede comprender una molécula de ADN o de ADNc insertada en un vector, tal como un vector rAAV.

20 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presenta el mismo significado que entiende comúnmente un experto ordinario en la materia a la que pertenece esta invención.

25 Diversos términos relacionados con las moléculas biológicas de la invención se utilizan en la presente memoria anteriormente y asimismo en toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones.

30 Como se utiliza en la presente memoria, las formas singulares "un", "una", y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a "un ácido nucleico" incluye una pluralidad de tales ácidos nucleicos, la referencia a "un vector" incluye una pluralidad de tales vectores, y la referencia a "un virus" o "partícula" incluye una pluralidad de tales virus/partículas.

35 Como se utiliza en la presente memoria, todos los valores numéricos o intervalos numéricos incluyen números enteros dentro de tales intervalos y fracciones de los valores o los números enteros dentro de intervalos, excepto que el contexto indique claramente lo contrario. De este modo, como ilustración, la referencia a 80 % o más de identidad incluye 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % etc., así como 81.1 %, 81.2 %, 81.3 %, 81.4 %, 81.5 %, etc., 82.1 %, 82.2 %, 82.3 %, 82.4 %, 82.5 %, etc., y así sucesivamente.

40 La referencia a un número entero con más (mayor que) o menos de incluye cualquier número mayor o menor que el número de referencia, respectivamente. Así, por ejemplo, una referencia a menor que 100, incluye 99, 98, 97, etc. hasta llegar al número uno (1); y menor que 10, incluye 9, 8, 7, etc. hasta el número uno (1).

45 Como se utiliza en la presente memoria, todos los valores o intervalos numéricos incluyen fracciones de los valores y números enteros dentro de tales intervalos, y fracciones de los números enteros dentro de tales intervalos, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De este modo, como ilustración, la referencia a un intervalo numérico tal como 1-10, incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, así como 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, etc., y así sucesivamente. La referencia a un intervalo de 1 a 50 incluye por lo tanto 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, etc., hasta e incluyendo 50, así como 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, etc., 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, etc., y así sucesivamente.

55 La referencia a una serie de intervalos incluye intervalos que combinan los valores de los límites de diferentes intervalos dentro de la serie. De este modo, como ilustración, la referencia a una serie de intervalos, por ejemplo de 1-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-75, 75-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-400, 400-500, 500-750, 750-850, incluye intervalos de 1-20, 1-30, 1-40, 1-50, 1-60, 10-30, 10-40, 10-50, 10-60, 10-70, 10-80, 20-40, 20-50, 20-60, 20-70, 20-80, 20-90, 50-75, 50-100, 50-150, 50-200, 50-250, 100-200, 100-250, 100-300, 100-350, 100-400, 100-500, 150-250, 150-300, 150-350, 150-400, 150-450, 150-500, etc.

60 La invención se describe generalmente en la presente memoria usando lenguaje afirmativo para describir las numerosas formas de realización y aspectos.

65 Se ha descrito un número de formas de realización de la invención. En consecuencia, los siguientes ejemplos pretenden ilustrar pero no limitar de ninguna manera el alcance de la invención reivindicada.

## Ejemplos

**Ejemplo 1** Una de muchas hipótesis que pueden explicar la pérdida y/o agregación de vectores rAAV es que la capa de gel se puede acumular en el aparato de TFF en el procedimiento de UF/DF no optimizado, lo que puede ser la causa de la pérdida del vector rAAV. Esta hipótesis de la acumulación de una capa de gel asimismo puede explicar el fenómeno de que se pierde más vector rAAV cuando el vector rAAV se concentra hasta una concentración elevada, puesto que se puede acumular una capa de gel más intensa cuando el vector está más concentrado. La acumulación de la capa de gel asimismo puede provocar la agregación de rAAV, el fenómeno observado bastante a menudo en el procedimiento de UF/DF, particularmente cuando los vectores rAAV se concentran hasta una concentración elevada.

**Ejemplo 2** Además de los parámetros operativos de TFF, una de las muchas hipótesis es que la formulación puede desempeñar un papel importante en la reducción de la capa de gel y en la prevención de la agregación de rAAV; para la mayoría de las disoluciones/amortiguadores usados en el procedimiento actual de UF/DF, las sustancias químicas usadas en los amortiguadores/disolución son sales y sustancias químicas para controlar el pH. Si se usó un tensioactivo en la disolución de UF/DF durante el procedimiento, puede reducir la asociación entre los vectores rAAV y la superficie del aparato de UF/DF. A su vez, esto podría reducir o evitar la capa de gel de vector rAAV a través del procedimiento de UF/DF. Además, el tensioactivo puede reducir la asociación de rAAV al reducir o evitar la interacción hidrófoba mientras se lleva a cabo el procedimiento de UF/DF, reduciendo, minimizando o evitando de ese modo la agregación de rAAV. Otras hipótesis son que el incremento de la velocidad de cizallamiento y el control de la presión transmembranaria (TMP) durante el procedimiento de UF/DF puede reducir acumulación de la capa de gel. Sobre la base de todas estas hipótesis, se llevaron a cabo una serie de estudios que condujeron a las formulaciones y parámetros operativos de la invención particulares descritos en la presente memoria.

**Ejemplo 3** Según la invención, se desean nuevos parámetros operativos de UF/DF que reducen, minimizan o evitan la agregación de rAAV y aumentan la recuperación (rendimiento global) de vectores rAAV, lo que es particularmente relevante cuando se desean preparaciones con título elevado de vectores rAAV. El primer parámetro operativo es comenzar el procedimiento de UF/DF con un título de rAAV bajo, especialmente cuando las preparaciones de vectores rAAV contienen una concentración elevada de rAAV, por ejemplo, en centrifugación con gradiente de CsCl antes de la etapa de UF/DF. El rAAV altamente concentrado en el CsCl se diluyó primero hasta un título de o por debajo de  $5E+12$  vg/ml usando un amortiguador de diafiltración creado que contiene fosfato de sodio 10 mM, NaCl 180 mM, y 0.001 % de pluronic F-68, a pH 7.3. Hacer funcionar el procedimiento de DF usando el amortiguador de diafiltración creado a un caudal con velocidad de cizallamiento a aproximadamente  $8,000\text{ s}^{-1}$  o mayor. Finalizar el procedimiento de diafiltración para lograr un intercambio eficiente de amortiguador, iniciar a continuación el procedimiento de UF para concentrar el vector rAAV hasta un título deseado.

Un componente que debe presentar la formulación de UF/DF recién creada es Pluronic F-68, que logró un título elevado de las preparaciones de rAAV. Aunque no se desea estar limitados por la teoría, se cree que esta nueva formulación (amortiguador de diafiltración) reduce la formación de la capa de gel.

Cuando la nueva formulación se combina con los nuevos parámetros operativos en el procedimiento de UF/DF, el vector rAAV se concentró hasta  $5E+13$  vg por ml, sin agregación de detectable del vector. Además, la recuperación del vector rAAV fue sustancial, típicamente a nivel de 70 % o mayor.

REIVINDICACIONES

1. Método para producir partículas de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) con una recuperación elevada o un título elevado, comprendiendo dicho método las etapas de:

- (a) recolectar células y/o sobrenadante de cultivo celular que comprenden partículas de vector rAAV;
- (b) opcionalmente concentrar dichas células y/o dicho sobrenadante de cultivo celular recolectados en la etapa (a), opcionalmente mediante filtración de flujo tangencial, para producir una recolección concentrada;
- (c) lisar dicha recolección producida en la etapa (a) o dicha recolección concentrada producida en la etapa (b), opcionalmente mediante microfluidización, para producir un lisado;
- (d) filtrar dicho lisado producido en la etapa (c) para producir un lisado clarificado;
- (e) someter dicho lisado clarificado producido en la etapa (d) a cromatografía en columna de intercambio iónico para producir un eluato de columna compuesto por partículas de vector rAAV purificadas, y opcionalmente concentrar dicho eluato de columna mediante filtración de flujo tangencial para producir un eluato de columna concentrado;
- (f) mezclar dicho eluato de columna o dicho eluato de columna concentrado producido en la etapa (e) con cloruro de cesio para producir una mezcla, y someter dicha mezcla a ultracentrifugación en gradiente para separar sustancialmente partículas de vector rAAV auténtico de partículas de AAV de producto génico y otras impurezas relacionadas con el vector AAV;
- (g)(1) recoger dichas partículas de vector rAAV auténtico separadas en la etapa (f) y
- (g)(2) formular dichas partículas de vector rAAV auténtico recogidas en un amortiguador con un tensioactivo no iónico;
- (h) someter dichas partículas de vector rAAV auténtico en la etapa (g)(2) a un intercambio de amortiguador mediante filtración de flujo tangencial para producir una formulación de vector AAV; e
- (i) filtrar dicha formulación de vector AAV producida en la etapa (h) produciendo así una formulación de partículas de vector rAAV auténtico con una recuperación elevada o un título elevado.

2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho amortiguador de la etapa (g)(2) comprende

- (1) cloruro sódico, y/o fosfato sódico; o
- (2) cloruro sódico de una concentración de aproximadamente 5 mM hasta una concentración de aproximadamente 500 mM.

3. Método según la reivindicación 1, en el que dicho tensioactivo no iónico de la etapa (g)(2)

- (1) comprende un polialquilenglicol;
- (2) comprende un copolímero en bloque que comprende por lo menos un bloque de polietilenglicol y por lo menos un bloque de polipropilenglicol;
- (3) comprende un alquilpoliglicósido, alcohol cetoestearílico, alcohol cetílico, cocamida DEA, cocamida MEA, decilglucósido, etoxilato, IGEPAL CA-630, Isoceteth-20, glucósidos, maltósidos, monolaurina, nonidet P-40, nonoxinolos tales como nonoxinol-9, NP-40, éter monododecílico de octaetilenglicol, N-octil beta-D-tioglucopiranosidos, octilglucósidos, alcohol oleílico, glicéridos de girasol PEG-10, éter monododecílico de pentaetilenglicol, poloxámeros tales como poloxámero 407, poloxámero 188 (poli(óxido de etileno-copolioóxido de propileno)), polirricinoleato de poliglicerol, sorbitanos, alcohol estearílico, Triton X-100, o Tween 80;
- (4) comprende cetomacrogol 1000, polisorbatos tales como polisorbato 20 (monolaurato de polioxietilen (20) sorbitán), polisorbato 40 (monopalmitato de polioxietilen (20) sorbitán), polisorbato 60 (monoestearato de polioxietilen (20) sorbitán), polisorbato 80 (monooleato de polioxietilen (20) sorbitán); polirricinoleato de poliglicerol, éster [2-[(2R,3S,4R)-3,4-dihidroxi-2-tetrahidrofuranil]-2-hidroxietílico] de ácido octadecanoico, éster [(2R,3S,4R)-2-[1,2-bis(1-oxooctadecoxi)etil]-4-hidroxi-3-tetrahidrofuranílico] de ácido octadecanoico; alcoholes de cadena larga C8 a C22 tales como 1-octadecanol, alcohol cetilestearílico, hexadecan-1-ol y cis-9-octadecen-1-ol; octilfenol sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes pueden incluir un grupo polietoxietanol (por ejemplo, para formar octilfenoxipolietoxietanol) o cualquier otro sustituyente que formará

un tensioactivo no iónico con octilfenol; éter monoisohexadecílico de polietilenglicol; éster 2,3-dihidroxipropílico de ácido dodecanoico; los glucósidos pueden incluir laurilglucósido, octilglucósido y decilglucósido; amidas de ácidos grasos tales como cocamida dietanolamina y cocamida monoetanolamina; o tensioactivos no iónicos que presentan una cadena hidrófila de polióxido de etileno y un grupo lipófilo o hidrófilo de hidrocarburo aromático, tal como Nonoxinol-9 y Triton X-100;

(5) comprende un polietilenglicol-bloque-polipropilenglicol-bloque-polietilenglicol o un copolímero tribloque compuesto por una cadena hidrófoba central de polioxipropileno (poli(óxido de propileno)) flanqueada por dos cadenas hidrófilas de polioxietileno (poli(óxido de etileno)); o

(6) presenta una concentración de aproximadamente 0.0001 % hasta una concentración de aproximadamente 0.1 %.

4. Método según la reivindicación 1, en el que

(1) dichas partículas de vector rAAV auténtico están presentes en dicha formulación producida en la etapa (i) a una concentración de aproximadamente  $10^{15}$  partículas por ml a aproximadamente una concentración de  $10^{18}$  partículas de vector rAAV auténtico por ml;

(2) el rendimiento de dichas partículas de vector rAAV auténtico en la etapa (i) es por lo menos aproximadamente  $5 \times 10^{12}$  partículas de vector rAAV auténtico/ml; o

(3) la recuperación de dichas partículas de vector rAAV auténtico en la etapa (i) es por lo menos aproximadamente 60 % de las partículas de vector rAAV totales de la etapa (a).

5. Método según la reivindicación 1, en el que dichas partículas de vector rAAV auténtico derivan de un AAV seleccionado de entre el grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 y Rh74.

6. Método según la reivindicación 1, en el que

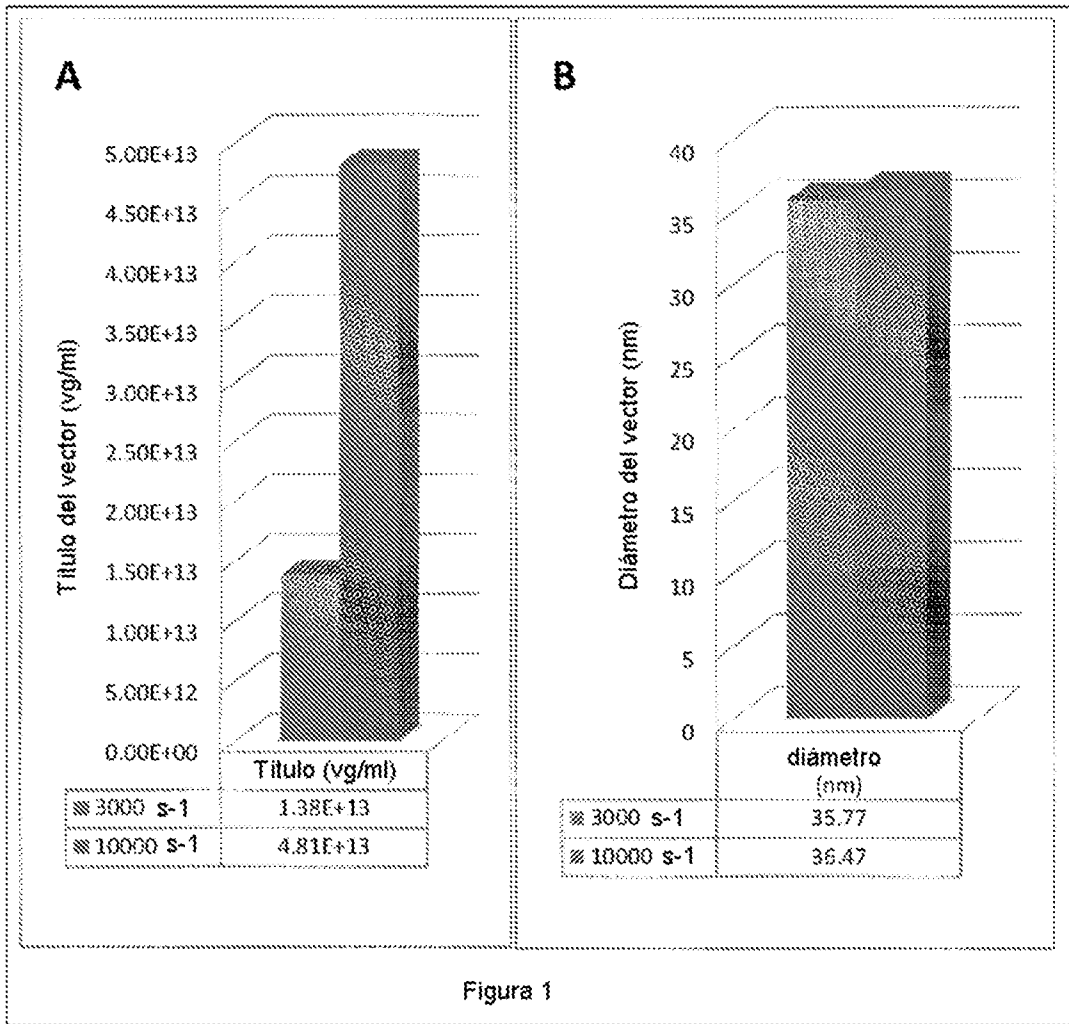
(1) dichas partículas de rAAV auténtico comprenden un transgén que codifica un ácido nucleico inhibidor;

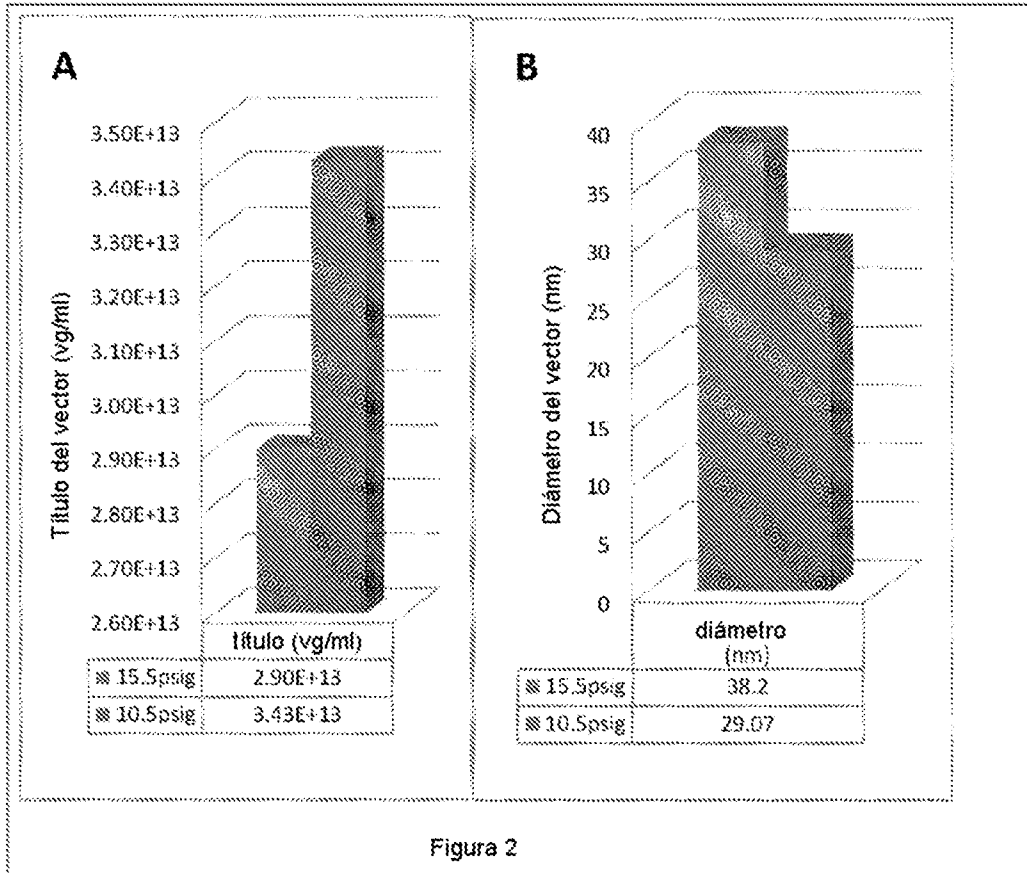
(2) dichas partículas de rAAV auténtico comprenden un transgén que codifica un producto génico seleccionado de entre el grupo que consiste en insulina, glucagón, hormona del crecimiento (GH), hormona paratiroidea (PTH), factor liberador de la hormona del crecimiento (GRF), hormona estimulante de folículos (FSH), hormona luteinizante (LH), gonadotropina coriónica humana (hCG), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyetinas, angiostatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF), factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factor ácido de crecimiento de fibroblastos (aFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor  $\alpha$  de crecimiento transformante (TGF $\alpha$ ), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores I y II de crecimiento de insulina (IGF-I e IGF-II), TGF $\beta$ , activinas, inhibinas, proteína morfogénica ósea (BMP), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofinas NT-3 y NT4/5, factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado de estirpe de células gliales (GDNF), neurturina, agrina, netrina-1 y netrina-2, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), efrinas, nogina, *sonic hedgehog*, y tirosina hidroxilasa;

(3) dichas partículas de rAAV auténtico comprenden un transgén que codifica un producto génico seleccionado de entre el grupo que consiste en trombopoyetina (TPO), interleucinas (IL1 a IL-17), proteína quimiotáctica de monocitos, factor inhibidor de la leucemia, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, ligando de Fas, factores  $\alpha$  y  $\beta$  de necrosis tumoral, interferones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , factor de células troncales, ligando de flk-2/flt3, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, inmunoglobulinas quiméricas, anticuerpos humanizados, anticuerpos monocatenarios, receptores de linfocitos T, receptores de linfocitos T quiméricos, receptores de linfocitos T monocatenarios, moléculas del MHC clase I y clase II;

(4) dichas partículas de vector rAAV auténtico comprenden un transgén que codifica una proteína útil para la corrección de errores congénitos del metabolismo seleccionada de entre el grupo que consiste en carbamoíl sintetasa I, ornitina transcarbamilasa, arginosuccinato sintetasa, arginosuccinato liasa, arginasa, fumarilacetato hidrolasa, fenilalanina hidroxilasa, antitripsina alfa-1, glucosa-6-fosfatasa, porfobilinógeno desaminasa, factor V, factor VIII, factor IX, cistationa beta-sintasa, descarboxilasa cetoácida de cadena ramificada, albúmina, isovaleril-coA deshidrogenasa, propionil CoA carboxilasa, metil malonil CoA mutasa, glutaril CoA deshidrogenasa, insulina, beta-glucosidasa, piruvato carboxilato, fosforilasa hepática, fosforilasa cinasa, glicina descarboxilasa, RPE65, proteína H, proteína T, una secuencia de regulador transmembranario de fibrosis quística (CFTR), y una secuencia de ADNc de distrofina;

- (5) dichas partículas de vector rAAV auténtico comprenden un transgén que codifica una proteína útil para la corrección de enfermedades neurodegenerativas; o
- 5 (6) dicha proteína es tripeptidil peptidasa 1 (TPP1).
7. Método según la reivindicación 6, parte (1), en el que dicho ácido nucleico inhibidor se selecciona de entre el grupo que consiste en ARNip, una molécula antisentido, miARN, ribozima, y ARNhc.
- 10 8. Método según la reivindicación 1, que comprende recoger las partículas de cápsidas vacías de manera separada en la etapa (f).
9. Método según la reivindicación 1, en el que la pureza de dichas partículas de vector rAAV auténtico en dicho filtrado de la etapa (i) es por lo menos aproximadamente 80 %.
- 15 10. Método según la reivindicación 1, en el que dichas partículas de cápsidas vacías están presentes en dicho filtrado de la etapa (i) en una cantidad de 10 % o menos.
11. Método según la reivindicación 1, en el que dicho filtrado de la etapa (i) presenta no más de aproximadamente 10 % de partículas de rAAV agregadas.
- 20 12. Método según la reivindicación 1, en el que dicha centrifugación en la etapa (f)
- (1) se lleva a cabo en una única etapa; o
- 25 (2) es una ultracentrifugación en gradiente de densidad.
13. Método según la reivindicación 1, en el que dicho eluato de columna en la etapa (e) se concentra mediante filtración de flujo tangencial para producir un eluato de columna concentrado.
- 30 14. Método según la reivindicación 1, que comprende además añadir una nucleasa al lisado producido en la etapa (c).
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el método produce unas partículas de vector rAAV que presentan un título superior a las partículas de vector rAAV producidas en las que se añade un tensioactivo no iónico a la formulación de vector AAV después del intercambio de amortiguador mediante filtración de flujo tangencial de la etapa (h).
- 35 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que las partículas de vector rAAV auténtico recogidas de la etapa (g)(1) se diluyen hasta una concentración de menos de aproximadamente  $5 \times 10^{12}$  partículas de vector rAAV/ml, antes de, sustancialmente de manera simultánea, o después de la etapa (g)(2).
- 40 17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la filtración de flujo tangencial de las etapas (b), (e) y/o (h) se lleva a cabo
- 45 (1) a una presión transmembranaria de entre aproximadamente 2-15 psig; o
- (2) a una velocidad de cizallamiento superior a aproximadamente  $3000 \text{ s}^{-1}$ .





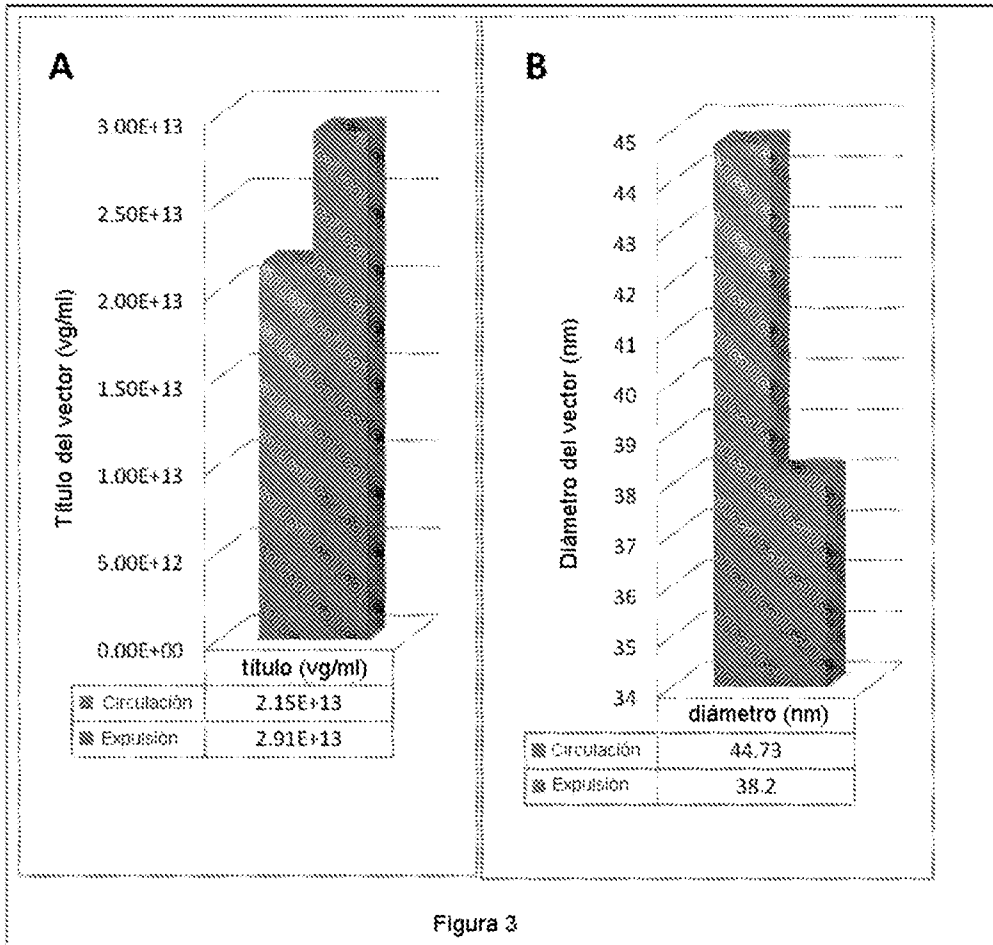


Figura 3

