

(12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 47687 B1** (51) Cl. internationale : **A61K 35/76; C12N 7/00; A61K 48/00**
- (43) Date de publication : **29.03.2024**
-
- (21) N° Dépôt : **47687**
- (22) Date de Dépôt : **27.02.2018**
- (30) Données de Priorité : **28.02.2017 US 201762464748 P**
- (86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT: **PCT/US2018/019992 27.02.2018**
- (71) Demandeur(s) : **The Trustees of The University of Pennsylvania, 3600 Civic Center Boulevard, 9th Floor Philadelphia, PA 19104 (US)**
- (72) Inventeur(s) : **WILSON, James, M. ; WANG, Qiang ; GILES, April ; TURNER, Kevin**
- (74) Mandataire : **SABA & CO.,TMP**
- (86) N° de dépôt auprès de l'organisme de validation :18711202.4

(54) Titre : **VECTEURS DE VIRUS ADÉNO-ASSOCIÉ DE CLADE F, ET LEURS UTILISATIONS**

(57) Abrégé : L'invention concerne un vecteur de virus adéno-associé recombinant (rAAV) comprenant une capsid AAVhu68 produite dans un système de production comprenant une séquence nucléotidique SEQ ID NO: 1, ou une séquence au moins identique à 75 % à celle-ci qui code pour la SEQ ID NO: 2. La capsid AAVhu68 comprend des sous-populations de résidus asparagine hautement désamidés dans des paires asparagine-glycine dans la séquence d'acides aminés SEQ ID NO: 2. L'invention concerne également des compositions comprenant le rAAV et des utilisations de celles-ci. De plus, l'invention concerne un rAAV ayant une capsid AAV modifiée comprenant au moins une sous-population de protéines vp1 ou vp2 ayant une Val à la position de l'acide aminé 157 par rapport à la numérotation de l'AAVhu68 vp1.

Revendications

1. Virus adéno-associé recombiné (rAAV) qui comprend une capsid AAVhu68 et un génome de vecteur dans la capsid AAVhu68, dans lequel :

(A) le génome de vecteur comprend une molécule d'acide nucléique comprenant des séquences de répétition terminales (ITR) inversées d'AAV et entre les ITR une séquence d'acides nucléiques non-AAV codant pour un produit lié fonctionnellement à des séquences qui dirigent l'expression du produit dans une cellule cible mammalienne ; et (B) la capsid AAVhu68 comprend des protéines AAVhu68 vp1, des protéines AAVhu68 vp2 et des protéines AAVhu68 vp3 produites à partir d'une séquence d'acides nucléiques codant pour la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 2, dans lequel les protéines AAVhu68vp1 comprennent un acide glutamique à la position 67 et une valine à la position 157 et les protéines AAVhu68vp2 comprennent une valine à la position 157 en fonction de la numérotation de SEQ ID NO: 2.

2. rAAV selon la revendication 1, dans lequel la capsid AAVhu68 comprend des sous-populations des protéines AAVhu68 vp1, AAVhu68 vp2 et AAVhu68 vp3, les sous-populations des protéines AAVhu68 vp1, AAVhu68 vp2 et AAV hu68 vp3 comprenant au moins 50 % à 100 % d'asparagines désamidées (N) dans des paires asparagine-glycine à chacune des positions 57, 329, 452, 512, par rapport aux acides aminés dans SEQ ID NO: 2, les asparagines désamidées étant désamidées en acide aspartique, acide isoaspartique, une paire acide aspartique/acide isoaspartique d'interconversion, ou des combinaisons de ceux-ci, comme déterminé à l'aide d'une spectrométrie de masse.

3. Virus adéno-associé recombiné (rAAV) qui comprend une capsid AAVhu68 et un génome de vecteur dans la capsid AAVhu68, dans lequel :

(A) le génome de vecteur comprend une molécule d'acide nucléique comprenant des séquences de répétition terminales (ITR) inversées d'AAV et entre les ITR une séquence d'acides nucléiques non-AAV codant pour un produit lié fonctionnellement à des séquences qui dirigent l'expression du produit dans une cellule cible mammalienne ; et (B) la capsid AAVhu68 comprend des populations hétérogènes de protéines AAVhu68 vp1, AAVhu68 vp2 et AAVhu68 vp3,

les protéines AAVhu68 vp1 étant les acides aminés 1 à 736 de SEQ ID NO: 2 (vp1) qui comprennent un acide glutamique à la position 67 et une valine à la position 157 et qui comprennent en outre des souspopulations de protéines vp1 comprenant des acides aminés modifiés en fonction des positions d'acide aminé dans SEQ ID NO: 2, les protéines AAVhu68 vp2 étant les acides aminés 138 à 736 de SEQ ID NO: 2 (vp2) qui comprennent une valine à la position 157 et qui comprennent en outre des souspopulations de protéines vp2 comprenant des acides aminés modifiés en fonction des positions d'acide aminé dans SEQ ID NO: 2, et les protéines AAVhu68 vp3 étant les acides aminés 203 à 736 de SEQ ID NO: 2 (vp3), qui comprennent des sous-populations de protéines vp3 comprenant des acides aminés modifiés en fonction des positions d'acide aminé dans SEQ ID NO: 2, les sous-populations des protéines AAVhu68 vp1, AAVhu68 vp2 et AAV hu68 vp3 comprenant au moins 50 % à 100 % d'asparagines désamidées (N) dans des paires asparagine-glycine à chacune des positions 57, 329, 452, 512, par rapport aux acides aminés dans SEQ ID NO: 2, les asparagines désamidées étant désamidées en acide

aspartique, acide isoaspartique, une paire acide aspartique/acide isoaspartique d'interconversion, ou des combinaisons de ceux-ci, comme déterminé à l'aide d'une spectrométrie de masse.

4. rAAV selon la revendication 2 ou la revendication 3, dans lequel les sous-populations des protéines AAVhu68 vp1, vp2 et vp3 comprennent en outre :

(i) une ou plusieurs modifications choisies parmi : lysine acétylée, sérine et/ou thréonine phosphorylées, acide aspartique isomérisé, glutamines désamidées, tryptophane et/ou méthionine oxydés, ou un acide aminé amidé comme déterminé à l'aide d'une spectrométrie de masse ; et/ou

(ii) 1 % à 40 % de désamidation d'asparagine à une ou plusieurs des positions N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N336, N409, N410, N477, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709, ou combinaisons de celles-ci, en fonction de la numérotation de SEQ ID NO: 2, comme déterminé à l'aide d'une spectrométrie de masse.

5. rAAV selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, dans lequel les sous-populations de capsid AAVhu68 des protéines de capsid AAVhu68 vp1, vp2 et vp3 comprennent en outre

(a) au moins 65 % des asparagines (N) dans des paires asparagine-glycine localisées aux positions 57 des protéines vp1 sont désamidées, comme déterminé à l'aide d'une spectrométrie de masse, en fonction de la numérotation de SEQ ID NO: 2 ; et/ou

(b) au moins 75 % des N dans des paires asparagine-glycine à la position 329 des protéines vp1, vp2 et vp3 sont désamidées, comme déterminé à l'aide d'une spectrométrie de masse, en fonction de la numérotation des résidus de la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 2 ; et/ou

(c) au moins 50 % des N dans des paires asparagine-glycine à la position 452 des protéines vp1, vp2 et vp3 sont désamidées, comme déterminé à l'aide d'une spectrométrie de masse, en fonction de la numérotation des résidus de la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 2 ; et/ou

(d) au moins 75 % des N dans des paires asparagine-glycine à la position 512 des protéines vp1, vp2 et vp3 sont désamidées, comme déterminé à l'aide d'une spectrométrie de masse, en fonction de la numérotation des résidus de la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 2.

6. rAAV selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel la capsid AAVhu68 comprend :

(a) une sous-population de protéines vp1 dans laquelle 75 % à 100 % des N à la position 57 des protéines vp1 sont désamidées, comme déterminé à l'aide d'une spectrométrie de masse; et/ou

(b) des sous-populations de protéines vp1, de protéines vp2 et/ou de protéines vp3 dans lesquelles 75 % à 100 % des N à la position 329, en fonction de la numérotation de SEQ ID NO: 2, sont désamidées, comme déterminé à l'aide d'une spectrométrie de masse ; et/ou

(c) des sous-populations de protéines vp1, de protéines vp2, et/ou de protéines vp3 dans lesquelles 75 % à 100 % des N à la position 452, en fonction de la numérotation de SEQ ID NO: 2, sont désamidées, comme déterminé à l'aide d'une spectrométrie de masse ; et/ou

(d) des sous-populations de protéines vp1, de protéines vp2, et/ou de protéines vp3 dans lesquelles 75 % à 100 % des N à la position 512, en fonction de la numérotation de SEQ ID NO: 2, sont désamidées, comme déterminé à l'aide d'une spectrométrie de masse.

7. rAAV selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel la séquence d'acides nucléiques codant pour les protéines vp1 est SEQ ID NO: 1, ou une séquence au moins 80 % à au moins 99 % identique à SEQ ID NO: 1 qui code pour la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 2 ; facultativement dans lequel la séquence d'acides nucléiques est au moins 80 % à 97 % identique à SEQ ID NO: 1.

8. Composition comprenant une population mélangée de virus adéno-associé recombiné hu68 (rAAVhu68), dans laquelle chacun des rAAVhu68 est indépendamment choisi parmi un rAAV selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

9. rAAV selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, ou composition selon la revendication 8, dans lequel les séquences ITR d'AAV sont une ITR 5' et une ITR 3' provenant d'une source d'AAV autre que AAVhu68.

10. Composition selon l'une quelconque des revendications 8 ou 9, la composition étant formulée pour

(i) administration intrathécale, et le génome de vecteur comprenant une séquence d'acides nucléiques codant pour un produit pour administration au système nerveux central ;

(ii) administration intraveineuse ; ou

(iii) administration intranasale ou intramusculaire.