



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2173888 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 14/005 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2016.12.12
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2016.08.17
(86)	European Application Nr.	08779058.0
(86)	European Filing Date	2008.07.25
(87)	The European Application's Publication Date	2010.04.14
(30)	Priority	2007.07.26, EP, 07113257 2007.07.26, US, 952081 P
(84)	Designated Contracting States:	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
	Designated Extension States:	AL BA MK RS
(73)	Proprietor	UniQure IP B.V., Meibergdreef 61, 1105 BA Amsterdam Zuidoost, NL-Nederland
(72)	Inventor	BAKKER, Andrew, Christian, Leguaanstraat 23, 1338 HB Almere, NL-Nederland HERMENS, Wilhelmus, Theodorus, Johannes, Sprietzeil 83, 1319 EB Almere, NL-Nederland
(74)	Agent or Attorney	Zacco Denmark A/S, Arne Jacobsens Allé 15, DK-2300 KØBENHAVN S, Danmark

(54)	Title	BACULOVIRAL VECTORS COMPRISING REPEATED CODING SEQUENCES WITH DIFFERENTIAL CODON BIASES
(56)	References Cited:	WO-A-2007/046703 WO-A-2007/084773 US-A1- 2003 228 696 URABE M ET AL: "Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors" HUMAN GENE THERAPY, MARY ANN LIEBERT, NEW YORK ,NY, US, vol. 13, no. 16, 1 November 2002 (2002-11-01), pages 1935-1943, XP002394454 ISSN: 1043-0342 cited in the application KOHLEBRENNER ET AL: "Successful Production of Pseudotyped rAAV Vectors Using a Modified Baculovirus Expression System" MOLECULAR THERAPY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA., US, vol. 12, no. 6, December 2005 (2005-12), pages 1217-1225, XP005176630 ISSN: 1525-0016 cited in the application

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

Patentkrav

1. Insektcelle omfattende en første nukleotidsekvens som koder for en første aminosyresekvens, og en andre nukleotidsekvens som koder for en andre aminosyresekvens, hvori:
- 5 (a) den første og andre nukleotidsekvensen hver er operativt bundet til ekspresjonskontrollsekvensene for ekspresjon i en insektcelle;
- (b) den første og andre aminosyresekvensen omfatter en felles aminosyresekvens, hvorav minst 100 aminosyrer har minst 90 %
- 10 aminosyresyreidentitet mellom den første og andre aminosyresekvensen;
- (c) nukleotidsekvensene som koder for den felles aminosyresekvensen i den første og andre aminosyresekvensen, er mindre enn 90 % identiske;
- (d) kodonanvendelse til den første nukleotidsekvensen som koder for den felles aminosyresekvensen, er tilpasset til kodonanvendelsen til insektvertscellen;
- 15 (e) den første nukleotidsekvensen koder for aminosyresekvensen til et parvoviralt Rep52- eller 40-protein, og den andre nukleotidsekvensen koder for aminosyresekvensen til et parvoviralt Rep78- eller 68-protein; og,
- (f) den felles aminosyresekvensen omfatter aminosyresekvensene fra den andre aminosyren til den ytterste C-terminale aminosyren til det parvovirale Rep52-
- 20 eller 40-proteinet.
2. Insektcelle ifølge krav 1, hvori nukleotidsekvensene som koder for den felles aminosyresekvensen i den første og andre aminosyresekvensen, er mindre enn 80 % identiske.
- 25 3. Insektcelle ifølge krav 1 eller krav 2, hvori de felles aminosyresekvensene i den første og andre aminosyresekvensen deler minst 99 % aminosyreidentitet, foretrukket 100 % aminosyreidentitet.
- 30 4. Insektcelle ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori nukleotidsekvensen som koder for den felles aminosyresekvensen i den første nukleotidsekvensen, har en forbedret kodonanvendelsesbias for insektcellene sammenlignet med nukleotidsekvensen som koder for den felles aminosyresekvensen i den andre nukleotidsekvensen, hvori forskjellen i
- 35 kodontilpasningsindeks mellom nukleotidsekvensen som koder for den felles aminosyresekvensen i den første og andre nukleotidsekvensen, er minst 0,2.

5. Insektcelle ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori nukleotidsekvensen som koder for den felles aminosyresekvensen i nukleotidsekvensen med den forbedrede kodonanvendelsesbiasen, omfatter et kontinuerlig segment på minst 25 kodoner, der alle er felles kodoner i samsvar med tabell 1 eller tabell 2, hvori foretrukket alle kodoner i nukleotidsekvensen som koder for den felles aminosyresekvensen i nukleotidsekvensen med den forbedrede kodonanvendelsesbiasen, er felles kodoner i samsvar med tabell 1 eller tabell 2, og hvori mer foretrukket alle kodoner i nukleotidsekvensen som koder for den felles aminosyresekvensen i den andre nukleotidsekvensen, er de nest vanligste kodonene i samsvar med tabell 1 eller tabell 2.
6. Insektcelle ifølge et hvilket som helst av kravene 1 - 5, hvori minst 50 % av kodonene i nukleotidsekvensen som koder for den felles aminosyresekvensen i den andre nukleotidsekvensen, er endret sammenlignet med det korresponderende kodonet i den første nukleotidsekvensen for å maksimere AT- eller GC-innholdet i den andre nukleotidsekvensen.
7. Insektcelle ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori den første og andre nukleotidsekvensen er del av én enkelt nukleinsyrekonstruksjon.
8. Insektcelle ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori de parvovirale Rep-proteinene er adeno-assosierte virus (AAV) Rep-proteiner, hvori foretrukket de parvovirale Rep-proteinene som er kodet den første og andre nukleotidsekvensen, er av samme serotype.
9. Insektcelle ifølge et hvilket som helst av kravene 1 - 8, hvori den første nukleotidsekvensen koder for et parvoviralt Rep52-protein og er valgt fra gruppen bestående av:
- a) en nukleotidsekvens som koder for et polypeptid omfattende en aminosyresekvens som har minst 70 % sekvensidentitet med aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO. 6;
 - b) en nukleotidsekvensen har minst 70 % sekvensidentitet med nukleotidsekvensen ifølge et hvilket som helst av SEQ ID NO 1 - 5 og 10;
 - c) en nukleotidsekvens hvis komplementære tråd hybridiserer til en nukleinsyremolekylsekvens ifølge (a) eller (b); og,
 - (d) en nukleotidsekvens hvis sekvens er forskjellig fra sekvensen til et nukleinsyremolekyl til (c) på grunn av degenerasjonen av den genetiske koden,

og hvori den andre nukleotidsekvensen koder for et parvoviralt Rep78-protein og er valgt fra gruppen bestående av:

a) en nukleotidsekvens som koder for et polypeptid omfattende en aminosyresekvens som har minst 70 % sekvensidentitet med

5 aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO. 8;

(b) en nukleotidsekvens som har minst 70 % sekvensidentitet med nukleotidsekvensen til posisjon 11 - 1876 ifølge SEQ ID NO. 7;

c) en nukleotidsekvens hvis komplementære tråd hybridiserer til en nukleinsyremolekylsekvensens ifølge (a) eller (b);

10 d) en nukleotidsekvens hvis sekvens er forskjellig fra sekvensen til et nukleinsyremolekyl ifølge (c) på grunn av degenerasjonen av den genetiske koden.

10. Insektcelle ifølge et hvilket som helst av kravene 1 - 9, hvori insektcellen ytterligere omfatter:

15

a) en tredje nukleotidsekvens omfattende minst én parvoviral invertert terminal-repetisjons- (ITR-)nukleotidsekvens; og

b) en fjerde nukleotidsekvens omfattende sekvenser som koder for parvoviralt kapsidprotein som er operativt bundet til ekspresjonskontrollsekvenser for ekspresjon i en insektcelle,

20

hvor foretrukket én eller flere av den første, andre, tredje og fjerde nukleotidsekvensen er del av en nukleinsyrekonstruksjon som er en insektcellekompatibel vektor, foretrukket en bakuloviral vektor.

11. Insektcelle ifølge krav 10, hvori den tredje nukleotidsekvensen ytterligere omfatter minst én nukleotidsekvens som koder for et genprodukt av interesse, og hvorved den minst ene nukleotidsekvensen som koder for et genprodukt av interesse, innkorporeres i genomet til en parvoviral vektor produsert i insektcellen, hvori foretrukket den tredje nukleotidsekvensen omfatter to parvovirale ITR-nukleotidsekvenser, og hvori den minst ene nukleotidsekvensen som koder for et genprodukt av interesse, er lokalisert mellom de to parvovirale ITR-nukleotidsekvensene.

25

30

12. Insektcelle ifølge krav 10 eller krav 11, hvori minst én av den første, andre sekvensen, tredje og fjerde nukleotidsekvensen er stabilt integrert i insektcellens genom.

35

13. Insektcelle ifølge et hvilket som helst av kravene 10 - 12, hvori parvoviruset er AAV.

5 14. Fremgangsmåte for å fremstille et rekombinant parvoviralt virion i en insektcelle, omfattende trinnene med:

a) å dyrke en insektcelle som definert i et hvilket som helst av kravene 10 - 13 under betingelser slik at rekombinant parvoviralt virion produseres; og,

b) gjenvinning av det rekombinante parvovirale virionet,

10 der fremgangsmåten foretrukket ytterligere omfatter trinnet med affinitetsrensing av virionet ved å anvende et immobilisert anti-parvoviralt antistoff, mer foretrukket et enkeltkjedet kamelid antistoff eller et fragment derav, og hvori foretrukket det rekombinante parvovirale virionet er et rekombinant AAV-virion.

15 15. Nukleinsyrekonstruksjon omfattende en første og en andre nukleotidsekvens som definert i et hvilket som helst av kravene 1 - 9.