



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2658967 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 7/02 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2022.02.21
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2021.11.10
(86)	European Application Nr.	11813781.9
(86)	European Filing Date	2011.12.30
(87)	The European Application's Publication Date	2013.11.06
(30)	Priority	2010.12.30, EP, 10016217
(84)	Designated Contracting States:	AL ; AT ; BE ; BG ; CH ; CY ; CZ ; DE ; DK ; EE ; ES ; FI ; FR ; GB ; GR ; HR ; HU ; IE ; IS ; IT ; LI ; LT ; LU ; LV ; MC ; MK ; MT ; NL ; NO ; PL ; PT ; RO ; RS ; SE ; SI ; SK ; SM ; TR
(73)	Proprietor	Sirion Biotech GmbH, Am Klopferspitz 19, 82152 Planegg/Martinsried, Tyskland
(72)	Inventor	THIRION, Christian, 80337 Munich, Tyskland
(74)	Agent or Attorney	ZACCO NORWAY AS, Postboks 488, 0213 OSLO, Norge

(54)	Title	MEANS FOR GENERATING ADENOVIRAL VECTORS FOR CLONING LARGE NUCLEIC ACIDS
(56)	References Cited:	US-B1- 6 379 943 US-A1- 2003 054 555 NG P ET AL: "YEAST RECOMBINASE FLP FUNCTIONS EFFECTIVELY IN HUMAN CELLS FOR CONSTRUCTION OF ADENOVIRUS VECTORS", 20000901, vol. 29, no. 3, 1 September 2000 (2000-09-01), pages 524-528, XP009026455, ISSN: 0736-6205 THIRION CHRISTIAN ET AL: "Adenovirus vectors based on human adenovirus type 19a have high potential for human muscle-directed gene therapy.", HUMAN GENE THERAPY FEB 2006 LNKD- PUBMED:16454653, vol. 17, no. 2, February 2006 (2006-02), pages 193-205, XP002671448, ISSN: 1043-0342 NG P ET AL: "A HIGH-EFFICIENCY CRE/LOXP-BASED SYSTEM FOR CONSTRUCTION OF ADENOVIRAL VECTORS", HUMAN GENE THERAPY, MARY ANN LIEBERT, NEW YORK ,NY, US, vol. 10, no. 16, 1 November 1999 (1999-11-01), pages 2667-2672, XP000864495, ISSN: 1043-0342, DOI: DOI:10.1089/10430349950016708

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. Kombinasjon av et nukleinsyremolekyl som også refereres til som tredje nukleinsyremolekyl, og et nukleinsyremolekyl som også refereres til som andre nukleinsyremolekyl,

hvor det tredje nukleinsyremolekylet omfatter

(1) et nukleinsyremolekyl omfattende de følgende elementene:

(a) en første del av et genom til et adenovirus, hvor den første delen av et genom til et adenovirus omfatter nøyaktig én invertert terminal repetisjon av et adenovirus;

(b) en nukleotidsekvens, foretrukket en genom nukleotidsekvens eller en transkripsjonsenhet;

(c) en regulatorisk nukleinsyresekvens som har en regulatorisk aktivitet i en prokaryot;

(d) nøyaktig ett stedspesifikt rekombinasjonssted som rekombinerer i nærvær av en samsvarende rekombinase;

(e) en nukleotidsekvens som tilveiebringer en negativ seleksjonsmarkør;

(f) en bakteriell nukleotidsekvensenhet omfattende (i) bakterielle nukleotidsekvenser for betinget replikasjon og (ii) en nukleotidsekvens som tilveiebringer en positiv seleksjonsmarkør; og

(g) et første restriksjonssted; eller

(2) et nukleinsyremolekyl omfattende en nukleotidsekvens ifølge SEQ ID NO: 6; eller

(3) et heterologt nukleinsyremolekyl omfattende et tredje nukleinsyremolekyl som definert i (1) inneholdt i organismen deponert med DSMZ-en under Budapest-konvensjonen under aksjonsnummer DSM 23754; og

hvor det andre nukleinsyremolekylet omfatter

(1) et nukleinsyremolekyl omfattende de følgende elementene:

(a) en bakteriell nukleotidsekvensenhet omfattende

(i) bakterielle nukleotidsekvenser for enkeltkopireplikasjon, og

(ii) en nukleotidsekvens som tilveiebringer en seleksjonsmarkør;

(b) nøyaktig ett stedspesifikt rekombinasjonssted som rekombinerer i nærvær av en samsvarende rekombinase;

EP2658967

2

(c) en andre del av et genom til et adenovirus, hvori den andre delen av et genom til et adenovirus omfatter nøyaktig én invertert terminal repetisjon av et adenovirus; og

(d) et restriksjonssted som refereres til som andre restriksjonssted; eller

5 (2) et nukleinsyremolekyl omfattende en nukleotidsekvens ifølge SEQ ID NO: 2 og/eller SEQ ID NO: 13 og/eller SEQ ID NO: 14; eller

(3) et heterologt nukleinsyremolekyl omfattende et andre nukleinsyremolekyl som definert i (1) inneholdt i organismen deponert med DSMZ-en under Budapest-konvensjonen under aksjesjonsnummer DSM 24298 og/eller DSM
10 24299;

hvori det andre nukleinsyremolekylet og det tredje nukleinsyremolekylet hver og uavhengig er enten et lineært molekyl eller et sirkulært molekyl, foretrukket det andre nukleinsyremolekylet er et sirkulært molekyl og det tredje nukleinsyremolekylet er et sirkulært molekyl;

15 hvori det andre nukleinsyremolekylet og det tredje nukleinsyremolekylet kompletterer hverandre for å danne et komplett viralt genom; og

hvori rekombinasen som rekombinerer rekombinasjonsstedet til det tredje nukleinsyremolekylet, er den samme som rekombinasen som rekombinerer rekombinasjonsstedet til det andre nukleinsyremolekylet.

20 **2.** Kombinasjonen ifølge krav 1, hvori i nukleinsyremolekylet til (1) den regulatoriske nukleinsyresekvensen som har en regulatorisk aktivitet i en prokaryot, tilveiebringer det stedsspesifikke rekombinasjonsstedet og nukleotidsekvensen en negativ seleksjonsmarkør som er anordnet i en 5'- -> 3'-
25 retning.

3. Kombinasjonen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 2, hvori det tredje nukleinsyremolekylet er et lineært molekyl, hvori elementene (a) til (f), foretrukket etter spalting av det sirkulære molekylet av det tredje
30 nukleinsyremolekylet med det første restriksjonsenzymet som gjenkjenner og spalter ved det første restriksjonsstedet, er anordnet i en 5'- -> 3'-retning i den følgende sekvensen som følger:

1. den første delen av et genom til et adenovirus;

EP2658967

3

2. nukleotidsekvensen, foretrukket den genome nukleotidsekvensen eller transkripsjonsenheten;
3. den regulatoriske nukleinsyresekvensen som har en regulatorisk aktivitet i en prokaryot;
- 5 4. det stedspesifikke rekombinasjonsstedet som rekombinerer i nærvær av en samsvarende rekombinase;
5. nukleotidsekvensen som tilveiebringer en negativ seleksjonsmarkør; og
6. den bakterielle nukleotidsekvensenheten omfattende (i) bakterielle nukleotidsekvenser for betinget replikasjon og (ii) en nukleotidsekvens som
- 10 tilveiebringer en positiv seleksjonsmarkør.

4. Kombinasjonen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, hvori adenoviruset er et humant adenovirus og foretrukket adenoviruset er humant adenovirustype 5, og mer foretrukket hele den venstre enden av adenovirustype

15 5 oppstrøms for TATA-boksen til E1-transkripsjonsenheten eller én eller flere deler derav.

5. Kombinasjonen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4, foretrukket krav 4, hvori de bakterielle nukleotidsekvensene for betinget replikasjon omfatter en replikasjonsopprinnelse, hvorved foretrukket replikasjonsopprinnelsen er den

20 minimale opprinnelsen av fag gR6K.

6. Kombinasjonen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5, foretrukket et hvilket som helst av kravene 4 til 5, hvori den regulatoriske sekvensen som har en regulatorisk aktivitet i en prokaryot er en sekvens som leder ekspresjon av en nukleotidsekvens i en prokaryot, foretrukket i en prokaryotisk vertscelle.

25

7. Kombinasjonen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 6, foretrukket hvilke som helst av kravene 5 til 6, hvori den negative seleksjonsmarkøren eller ekspresjonen av nukleotidsekvensen som tilveiebringer en negativ seleksjonsmarkør, medierer eller tildeler sensitivitet til et selekteringsmiddel og/eller en selekteringsbetingelse.

30

8. Kombinasjonen ifølge krav 7, hvori nukleotidsekvensen som tilveiebringer en negativ seleksjonsmarkør er et gen valgt fra gruppen omfattende *galK*-, *tetAR*-, *pheS*-, *thyA*-, *lacy*-, *ccdB*- og *rpsL*-genet.

- 5 **9.** Kombinasjon av et nukleinsyremolekyl som også refereres til som første nukleinsyremolekyl, og et nukleinsyremolekyl som også refereres til som andre nukleinsyremolekyl,
- hvor det første nukleinsyremolekylet omfatter
- (1) et nukleinsyremolekyl omfattende de følgende elementene:
- 10 (a) nøyaktig ett stedspesifikt rekombinasjonssted som rekombinerer i nærvær av en samsvarende rekombinase;
- (b) en bakteriell nukleotidsekvensenhet omfattende (i) bakterielle nukleotidsekvenser for betinget replikasjon og (ii) en nukleotidsekvens som tilveiebringer en første seleksjonsmarkør;
- 15 (c) en første del av et genom til et adenovirus, hvori den første delen av et genom til et adenovirus omfatter nøyaktig én invertert terminal repetisjon av et adenovirus;
- (d) en transkripsjonsenhet; og
- (e) et første restriksjonssted; eller
- 20 (2) et nukleinsyremolekyl omfattende en nukleotidsekvens ifølge SEQ ID NO:1 og/eller SEQ ID No:15; eller
- (3) et heterologt nukleinsyremolekyl omfattende et første nukleinsyremolekyl som definert i (1) inneholdt i organismen deponert med DSMZ-en ifølge Budapest-konvensjonen under aksjonsnummer DSM 23753;
- 25 og hvori det andre nukleinsyremolekylet omfatter
- (1) et nukleinsyremolekyl omfattende de følgende elementene:
- (a) en bakteriell nukleotidsekvensenhet omfattende
- (i) bakterielle nukleotidsekvenser for enkeltkopireplikasjon, og
- (ii) en nukleotidsekvens som tilveiebringer en seleksjonsmarkør;
- 30 (b) nøyaktig ett stedspesifikt rekombinasjonssted som rekombinerer i nærvær av en samsvarende rekombinase;
- (c) en andre del av et genom til et adenovirus, hvori den andre delen av et genom til et adenovirus omfatter nøyaktig én invertert terminal repetisjon av et adenovirus; og

(d) et restriksjonssted som refereres til som andre restriksjonssted; eller
(2) et nukleinsyremolekyl omfattende en nukleotidsekvens ifølge SEQ ID NO: 2
og/eller SEQ ID NO: 13 og/eller SEQ ID NO: 14; eller

5 (3) et heterologt nukleinsyremolekyl omfattende et andre nukleinsyremolekyl
som definert i (1) inneholdt i organismen deponert med DSMZ-en under
Budapest-konvensjonen under aksesjonsnummer DSM 24298 og/eller DSM
24299, hvori foretrukket nukleinsyremolekylet inneholdt i organismen er et
heterologt nukleinsyremolekyl;
og hvori det første nukleinsyremolekylet og det andre nukleinsyremolekylet hver
10 og uavhengig er enten et lineært molekyl eller et sirkulært molekyl, der
foretrukket det første nukleinsyremolekylet er et sirkulært molekyl og det andre
nukleinsyremolekylet er et sirkulært molekyl;
hvori det første nukleinsyremolekylet og det andre nukleinsyremolekylet
kompletterer hverandre for å danne et komplett viralt genom; og
15 hvori rekombinasen som rekombinerer rekombinasjonsstedet til det første
nukleinsyremolekylet er det samme som rekombinasen som rekombinerer
rekombinasjonsstedet til det andre nukleinsyremolekylet.

20 **10.** Kombinasjonen ifølge krav 9, hvori genomet til et adenovirus til det første
nukleinsyremolekylet er et humant adenovirusgenom, foretrukket et humant
adenovirusgenom som er forskjellig fra humant adenovirustype 5-genom, der
mer foretrukket genomet til et adenovirus til det første nukleinsyremolekylet er
et humant adenoviralt type 19a-genom.

25 **11.** Kombinasjonen ifølge et hvilket som helst av kravene 9 til 10, hvori de
bakterielle nukleotidsekvensene for betinget replikasjon av det første
nukleinsyremolekylet omfatter en replikasjonsopprinnelse.

30 **12.** Kombinasjonen ifølge et hvilket som helst av kravene 9 til 11, hvori
sekvensen som tilveiebringer en første seleksjonsmarkør for det første
nukleinsyremolekylet, er en nukleinsyresekvens som koder for et enzym som
tildeler resistens til en vertscelle som huser en slik nukleinsyresekvens som
koder for et enzym.

EP2658967

6

13. Kombinasjonen ifølge et hvilket som helst av kravene 9 til 12, hvori den første delen av et genom til et adenovirus til det første nukleinsyremolekylet er en adenoviral terminal repetisjon.

5 **14.** Kombinasjonen ifølge et hvilket som helst av kravene 9 til 13, hvori den første delen av et genom til et adenovirus til det første nukleinsyremolekylet inneholder den adenovirale promotoren pIX, der foretrukket den adenovirale promotoren pIX er en pIX-promotor fra humant adenovirus 19a.

10 **15.** Kombinasjonen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 14, hvori adenovirusgenomet til det andre nukleinsyremolekylet er et humant adenovirusgenom, hvorved hvis kombinasjonen ifølge krav 1, er adenovirusgenomet til det andre nukleinsyremolekylet foretrukket et humant adenovirustype 5-genom eller et humant adenoviralttype 19a-genom, og hvis
15 kombinasjonen ifølge krav 9, er adenovirusgenomet til det andre nukleinsyremolekylet foretrukket et humant adenovirusgenom som er forskjellig fra humant adenovirustype 5-genom, er mer foretrukket virusgenomet til det andre nukleinsyremolekylet et humant adenoviralttype 19a-genom.

20 **16.** Kombinasjonen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 15, hvori den bakterielle nukleotidsekvensen for enkeltkopireplikasjon av det andre nukleinsyremolekylet omfatter en replikasjonsopprinnelse for enkeltkopivedlikehold i prokaryotiske vertsceller.

25 **17.** Kombinasjonen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 16, hvori nukleotidsekvensen som tilveiebringer en seleksjonsmarkør for det andre nukleinsyremolekylet, er en nukleinsyresekvens som koder for et enzym som tildeler resistens til en vertscelle som huser en slik nukleinsyresekvens som koder for et enzym.

30 **18.** Kombinasjonen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 17, hvori den andre delen av et genom til et adenovirus til det andre nukleinsyremolekylet omfatter en adenoviral terminal repetisjon og den første delen av et genom til et adenovirus til det første nukleinsyremolekylet, og det tredje

nukleinsyremolekylet omfatter en adenoviral venstre omvendt terminal repetisjon.

19. Fremgangsmåte for genereringen av et nukleinsyremolekyl som koder for et virus omfattende de følgende trinnene

a) å tilveiebringe et tredje nukleinsyremolekyl som definert i et hvilket som helst av kravene 1 til 8;

b) å tilveiebringe et andre nukleinsyremolekyl som definert i et hvilket som helst av kravene 1 til 8; eller

c) å tilveiebringe en kombinasjon av et tredje nukleinsyremolekyl og et andre nukleinsyremolekyl ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 8 og 15 til 18;

d) å tillate det tredje og det andre nukleinsyremolekylet å reagere slik at en stedsspesifikk rekombinasjon oppstår, hvori den stedsspesifikke rekombinasjonen medieres ved hjelp av en stedsspesifikk rekombinase og den stedsspesifikke rekombinasjonen danner et rekombinasjonsprodukt omfattende en kopi, foretrukket enkeltkopi av genomet til et virus eller viruset, hvorved genomet er et komplementert komplett genom og det komplementerte komplette genomet komplementeres ved hjelp av den stedsspesifikke rekombinasjonen;

e) å velge rekombinasjonsproduktet; og

f) eventuelt å spalte rekombinasjonsproduktet med det første og det andre restriksjonsenzymet.

20. Fremgangsmåte for genereringen av et nukleinsyremolekyl som koder for et virus omfattende de følgende trinnene

a) å tilveiebringe en kombinasjon av et første nukleinsyremolekyl og et andre nukleinsyremolekyl ifølge et hvilket som helst av kravene 9 til 18;

b) å tillate det første og det andre nukleinsyremolekylet å reagere slik at en stedsspesifikk rekombinasjon oppstår, hvori den stedsspesifikke rekombinasjonen medieres ved hjelp av en stedsspesifikk rekombinase og den stedsspesifikke rekombinasjonen danner et rekombinasjonsprodukt omfattende en kopi,

foretrukket enkeltkopi av genomet til et virus eller viruset, hvorved genomet er et komplementert komplett genom og det komplementerte komplette genomet komplementeres ved hjelp av den stedsspesifikke rekombinasjonen;

c) å velge rekombinasjonsproduktet; og

EP2658967

8

d) eventuelt å spalte rekombinasjonsproduktet med det første og det andre restriksjonsenzymet.

5 **21.** Fremgangsmåten ifølge krav 19, hvori det tredje og det andre nukleinsyremolekylet reageres i en prokaryotisk vertscelle, foretrukket i *E. coli*.

22. Fremgangsmåten ifølge krav 20, hvori det første og det andre nukleinsyremolekylet reageres i en prokaryotisk vertscelle, foretrukket i *E. coli*.

10 **23.** Fremgangsmåte for å generere et bibliotek av nukleotidsekvenser, hvori biblioteket omfatter en flerhet enkelte nukleotidsekvenser, hvori biblioteket er representert ved hjelp av en flerhet virale genomer og hvert virale genom inneholder en eneste én av de enkelte nukleotidsekvensene, omfattende trinnene i fremgangsmåten som definert i hvilke som helst av kravene 19 og 21,
15 hvori den enkelte nukleotidsekvensen er en del av transkripsjonsenheten til det tredje nukleinsyremolekylet.

24. Fremgangsmåte for å generere et bibliotek av nukleotidsekvenser, hvori biblioteket omfatter en flerhet enkelte nukleotidsekvenser, hvori biblioteket er representert ved hjelp av en flerhet virale genomer og hvert virale genom inneholder en eneste én av de enkelte nukleotidsekvensene, omfattende trinnene i fremgangsmåten som definert i hvilke som helst av kravene 20 og 22,
20 hvori den enkelte nukleotidsekvensen er en del av transkripsjonsenheten til det første nukleinsyremolekylet.

25 **25.** Sett omfattende eventuelt et pakningsvedlegg og i (a) egnet/egnede beholder/-e, minst en kombinasjon av det tredje nukleinsyremolekylet og det andre nukleinsyremolekylet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 8 og 15 til 18.

30 **26.** Sett omfattende eventuelt et pakningsvedlegg og i (a) egnet/egnede beholder/-e, minst en kombinasjon av det første nukleinsyremolekylet og det andre nukleinsyremolekylet ifølge et hvilket som helst av kravene 9 til 18.

EP2658967

27. Settet ifølge et hvilket som helst av kravene 25 og 26, hvori nukleinsyremolekylet/nukleinsyremolekylene er inneholdt i en anvendelsesklar form, og/eller hvori settet inneholder en permissiv cellelinje som tilveiebringer en rekombinase og instruksjoner for anvendelse.