



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3423110 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/64 (2006.01)
C12N 15/66 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2021.11.22
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2021.08.11
(86)	European Application Nr.	17760963.3
(86)	European Filing Date	2017.03.03
(87)	The European Application's Publication Date	2019.01.09
(30)	Priority	2016.03.03, US, 201662303047 P 2016.09.14, US, 201662394720 P 2016.10.11, US, 201662406913 P
(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	University of Massachusetts, One Beacon Street 31st Floor, Boston, MA 02108, USA Voyager Therapeutics, Inc., 75 Sidney Street, Cambridge, Massachusetts 02139, USA
(72)	Inventor	KOTIN, Robert, M., 6510 Broxburn Dr., Bethesda, MD 20817, USA CECCHINI, Sylvain, 67 Adams St., Westborough, MA 01581, USA
(74)	Agent or Attorney	RWS, Europa House, Chiltern Park, Chiltern Hill, SL99FG CHALFONT ST PETER, Storbritannia

(54) Title **CLOSED-ENDED LINEAR DUPLEX DNA FOR NON-VIRAL GENE TRANSFER**

(56) References

Cited:

WO-A1-2012/123430

US-A- 5 658 548

US-A- 5 316 908

US-A- 4 683 195

US-B2- 8 241 622

HICKMAN, AB ET AL.: 'The Nuclease Domain of Adeno-Associated Virus Rep Coordinates Replication Initiation Using Two Distinct DNA Recognition Interfaces' MOLECULAR CELL vol. 13, 13 February 2004, pages 403 - 414, XP055412372

CATALDI, MP ET AL.: 'Hairpin end conformation of adeno-associated virus (AAV) genome determines interactions with DNA repair pathways' GENE THERAPY vol. 20, no. 6, June 2013, pages 686 - 693, XP055412409

BOHENZKY R A ET AL: "Sequence and symmetry requirements within the internal palindromic sequences of the adeno-associated virus terminal repeat", VIROLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 166, no. 2, 1 October 1988 (1988-10-01), pages 316-327, XP026732047, ISSN: 0042-6822, DOI: 10.1016/0042-6822(88)90502-8 [retrieved on 1988-10-01]

CHIORINI, JA: 'Sequence Requirements for Stable Binding and Function of Rep68 on the Adeno-Associated Virus Type 2 Inverted Terminal Repeats' JOURNAL OF VIROLOGY vol. 68, no. 11, November 1994, pages 7448 - 7457, XP055412373

GLAUSER, DL ET AL.: 'Four-Dimensional Visualization of the Simultaneous Activity of Alternative Adeno-Associated Virus Replication Origins' JOURNAL OF VIROLOGY vol. 79, no. 19, October 2005, pages 12218 - 12230, XP055412406

DOUGLAS M MCCARTY: "Self-complementary AAV Vectors; Advances and Applications", MOLECULAR THERAPY, vol. 16, no. 10, 1 October 2008 (2008-10-01), pages 1648-1656, XP055024491, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2008.171

CHENG, X ET AL.: 'Molecular weight determination of plasmid DNA using electrospray ionization mass spectrometry' NUCLEIC ACIDS RESEARCH vol. 24, no. 11, 1996, pages 2183 - 2189, XP008143859

LINA LI ET AL: "Production and Characterization of Novel Recombinant Adeno-Associated Virus Replicative-Form Genomes: A Eukaryotic Source of DNA for Gene Transfer", PLOS ONE, vol. 8, no. 8, 1 August 2013 (2013-08-01), pages 1-14, XP055416248, DOI: 10.1371/journal.pone.0069879

VIRAG, T 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, August 2009, pages 807 - 817, XP055052744

SAMULSKI R J ET AL: "Rescue of adeno-associated virus from recombinant plasmids: Gene correction within the terminal repeats of AAV", CELL, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 33, no. 1, 1 May 1983 (1983-05-01), pages 135-143, XP023912195, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/0092-8674(83)90342-2 [retrieved on 1983-05-01]

YAN, Z ET AL.: 'Inverted Terminal Repeat Sequences Are Important for Intermolecular Recombination and Circularization of Adeno-Associated Virus Genomes' JOURNAL OF VIROLOGY vol. 79, no. 1, January 2005, pages 364 - 379, XP002399264

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. Lineært dupleks-DNA med lukkede ender (ceDNA), omfattende et nukleinsyreinsert som omfatter et transgen, idet insertet er flankert av minst to
5 inverterte terminale gjentakelses- (ITR-) sekvenser av et adenoassosiert virus (AAV), hvor de minst to ITR-sekvenser er asymmetriske og kovalent forbundet i forhold til hverandre, idet hver sekvens har et operativt terminalt oppløsningssted og et rullende-sirkel-replikasjons-proteinbindingselement (RBE), hvor en første ITR-sekvens er avbrutt av en kryssarmsekvens som tildanner to motsatte, i lengderetningen symmetriske stem-
10 looper tildannet ved avbrutte palindromiske sekvenser B-B' og C-C', idet hver av de motsatte, i lengderetningen symmetriske stem-looper har et stem-avsnitt i området fra 5 til 15 basepar i lengde og et loop-avsnitt som har 2 til 5 uparede deoksyribonukleotider, hvor en andre ITR-sekvens er avbrutt av en trunkert kryssarmsekvens som har én eller flere delesjoner på mellom 11 og 20 nukleotider i en
15 palindromisk sekvensregion B-B' og/eller en palindromisk sekvensregion C-C'.
2. ceDNA ifølge krav 1, hvor
 - (i) ITR-ene har en lengde i området fra 40 til 1000 nukleotider, valgfritt en lengde på 100 til 160 nukleotider;
 - 20 (ii) kryssarmsekvensen har en Gibbs fri energi (ΔG) for utfolding under fysiologiske betingelser i området fra -12 kcal/mol til -30 kcal/mol, valgfritt -20 kcal/mol til -25 kcal/mol;
 - (iii) RBE-et omfatter sekvensen 5'-GCTCGCTCGCTC-3'; og/eller
 - (iv) det operative terminale oppløsningssted omfatter en sekvens 5'-TT-3' og/eller 3'-
25 enden av det operative terminale oppløsningssted er 15 til 25 nukleotider fra 5'-enden av rullende sirkel-replikasjons-proteinbindingselementet.
3. ceDNA ifølge krav 1 eller 2, hvor den trunkerte kryssarmsekvens tildanner to motsatte, i lengderetningen asymmetriske stem-looper, valgfritt hvor én av de motsatte,
30 i lengderetningen asymmetriske stem-looper har et stem-avsnitt i området fra 8 til 10 basepar i lengde og et loop-avsnitt som har 2 til 5 uparede deoksyribonukleotider, eller den ene i lengderetningen asymmetriske stem-loop har et stem-avsnitt som er mindre enn 8 basepar langt og et loopavsnitt som har 2 til 5 deoksyribonukleotider.
- 35 4. ceDNA ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, hvor nukleinsyreinsertet er manipulert til å uttrykke et protein eller funksjonelt RNA.
5. ceDNA ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4, hvor nukleinsyreinsertet er et

promotorløst konstruert som et substrat for genredigering valgt blant et substrat for TALENS, et substrat for sinkfingernukleaser (ZFN-er), et substrat for meganukleaser, et substrat for Cas9 og et substrat for et annet genredigeringsprotein.

- 5 6. ceDNA ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5, inneholdt i en vektor.
7. Sammensetning som omfatter en flerhet av ceDNA-er som beskrevet i et hvilket som helst av kravene 1 til 6, valgfritt hvor flerheten av ceDNA-er er forbundet ende-til-ende, valgfritt videre omfattende en farmasøytisk akseptabel bærer.
- 10 8. Vertscelle som omfatter ceDNA-et ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 6, valgfritt hvor vertscellen videre omfatter et rullende-sirkel-replikasjonsprotein som selektivt binder til nukleinsyrens RBE.
- 15 9. In vitro-fremgangsmåte for tilførsel av en heterolog nukleinsyre til en celle, idet fremgangsmåten omfatter å tilføre til cellen ceDNA-et ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 6.
- 20 10. ceDNA ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 6 for anvendelse i en fremgangsmåte for tilførsel av en heterolog nukleinsyre til et individ, hvor tilførselen ikke medfører en immunrespons mot nukleinsyren hos individet, valgfritt hvor immunresponsen er en humoral respons eller en cellulær respons.
- 25 11. ceDNA for anvendelse ifølge krav 10, hvor tilførselen finner sted én eller flere ganger.
- 30 12. Vertscelle ifølge krav 8 for anvendelse i en fremgangsmåte for tilførsel av en heterolog nukleinsyre til et individ, hvor tilførselen av vertscellen finner sted én eller flere ganger.
- 35 13. Fremgangsmåte for fremstilling av nukleinsyrer, idet fremgangsmåten omfatter:
(i) å innføre en ceDNA-nukleinsyre ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 6 i en permissiv celle in vitro, valgfritt hvor den permissive celle er en insektcellelinje, gjærcellelinje eller bakteriecellelinje; og
(ii) å holde den permissive celle under betingelser i hvilke et rullende-sirkel-replikasjonsprotein i den permissive celle initierer produksjon av atskillige kopier av nukleinsyren, hvor den permissive celle ikke uttrykker virale kapsidproteiner som er i stand til å pakke replikative kopier av nukleinsyren i en viruspartikkel, hvor rullende-

sirkel-replikasjonsproteinet velges fra gruppen bestående av AAV78, AAV52, AAV Rep68 og AAV Rep40; og valgfritt,

(iii) å rense de atskillige kopier av nukleinsyren, hvor rensingen valgfritt omfatter å bringe nukleinsyren i kontakt med en silikagelharpiks.

5

14. Fremgangsmåte ifølge krav 13, hvor rullende-sirkel-replikasjonsproteinet kodes av en Autographa-californica-multiple-nukleopolyhedrovirus (AcMNPV)-vektor eller en bakulovirus-ekspresjonsvektor (BEV).

10 15. ceDNA ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 6, hvor ceDNA-et omfatter en monomer nukleinsyre som omfatter en enkelt underenhet eller minst én multimer nukleinsyre som omfatter to eller flere underenheter, hvor hver underenhet omfatter nukleinsyreinsertet flankert av ITR-sekvensene.