



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3722434 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/86 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2022.12.05
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2022.07.27
(86)	European Application Nr.	19169121.1
(86)	European Filing Date	2019.04.12
(87)	The European Application's Publication Date	2020.10.14
(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	Freeline Therapeutics Limited, Stevenage Bioscience Catalyst Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2FX, Storbritannia
(72)	Inventor	HÖRER, Markus, Freeline Therapeutics GmbH Semmelweisstraße 3, 82152 Planegg-Steinkirchen, Tyskland SONNTAG, Florian, Freeline Therapeutics GmbH Semmelweisstraße 3, 82152 Planegg-Steinkirchen, Tyskland KOBBER, Renée, Freeline Therapeutics GmbH Semmelweisstraße 3, 82152 Planegg-Steinkirchen, Tyskland
(74)	Agent or Attorney	ZACCO NORWAY AS, Postboks 488, 0213 OSLO, Norge

(54)	Title	PLASMID SYSTEM
(56)	References Cited:	US-A1- 2005 080 027 CN-A- 108 048 483 US-A1- 2003 103 939

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/>

EP 3722434

Patentkrav

1. Hjelperplasmid som omfatter i det minste ett adenoassosiert virus (AAV)-rep-gen, som koder for i det minste ett funksjonelt AAV-Rep-protein og i det minste ett
5 hjelpervirusgen, og som ikke omfatter et cap-gen som koder for et funksjonelt sett av Cap-proteiner.
2. To-plasmidsystem, som omfatter hjelperplasmidet ifølge krav 1 og et vektorplasmid.
10
3. To-plasmidsystem ifølge krav 2, hvor:
 - (i) vektorplasmidet omfatter:
 - (a) et AAV-cap-gen som koder for i det minste ett funksjonelt AAV-Cap-protein; eller
 - 15 (b) i det minste én AAV-cap-gen-promotor, et kloningssted som er operativt forbundet med AAV-cap-gen-promotoren, og en ekspresjonskasset som på i det minste én side er flankert av en invertert terminal repetisjon (Inverted Terminal Repeat, ITR);
 - hvor vektorplasmidet ikke omfatter et rep-gen som koder for et funksjonelt Rep-protein, og ekspresjonskassetten omfatter et transgen som er operativt forbundet
20 med i det minste ett regulatorisk kontrollelement; og/eller
 - (ii) forholdet av hjelperplasmid til vektorplasmid er mellom 1:1 og 1:4.
4. To-plasmidsystem eller hjelperplasmid ifølge et hvilket som helst av de
25 foregående krav, hvor det i det minste ene AAV-rep-gen omfatter et gen som koder for et funksjonelt Rep-52-protein, i det minste ett gen som koder for et funksjonelt Rep-40-protein, og et gen som koder for et funksjonelt Rep-68-protein.
5. To-plasmidsystem eller hjelperplasmid ifølge et hvilket som helst av de
30 foregående krav, hvor:
 - (i) det i det minste ene AAV-rep-gen omfatter et gen som koder for et funksjonelt Rep-52-protein, og genet som koder for et funksjonelt Rep-52-

EP 3722434

protein omfatter en nukleinsyresekvens som har i det minste 98% identitet med den fulle lengde eller med et fragment med en lengde på i det minste 1000 nukleotider av nukleotider 993-2186 av SEQ ID NO: 1, eller med et tilsvarende nukleotidavsnitt i en annen AAV-serotype; og/eller

5

(ii)

(a) det i det minste ene AAV-rep-gen omfatter et gen som koder for et funksjonelt Rep-40-protein, og genet som koder for et funksjonelt Rep-40-protein omfatter en nukleinsyresekvens som har i det minste 98% identitet med den fulle lengde eller med et fragment med en lengde på i det minste 800 nukleotider av et nukleotidavsnitt som svarer til nukleotider 993-2252 minus nukleotider 1907-2227 av SEQ ID NO: 1, eller med tilsvarende nukleotidavsnitt i en annen AAV-serotype; og/eller

10

(b) det i det minste ene AAV-rep-gen omfatter et gen som koder for et funksjonelt Rep-40-protein, og genet som koder for et funksjonelt Rep-40-protein omfatter en nukleinsyresekvens som har i det minste 98% identitet med den fulle lengde eller med et fragment med en lengde på i det minste 1100 nukleotider av nukleotider 993-2252 av SEQ ID NO: 1, eller med et tilsvarende nukleotidavsnitt i en annen AAV-serotype; og/eller

15

(iii) det i det minste ene AAV-rep-gen omfatter et gen som koder for et funksjonelt Rep-68-protein, og genet som koder for et funksjonelt Rep-68-protein omfatter en nukleinsyresekvens som har i det minste 98% identitet med den fulle lengde eller med et fragment med en lengde på i det minste 1500 nukleotider av et nukleotidavsnitt som svarer til nukleotider 321-2252 minus nukleotider 1907-2227 av SEQ ID NO: 1, eller med tilsvarende nukleotidavsnitt i en annen AAV-serotype.

20

25

6. To-plasmidsystem eller hjelperplasmid ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor:

(i) hjelperplasmidet ikke omfatter et gen som koder for et funksjonelt Rep-78-protein; og/eller

30

(ii) hjelperplasmidet ikke omfatter en sammenhengende sekvens av i det minste 1800 nukleotider som svarer til et sammenhengende nukleotidavsnitt av tilsvarende lengde som er omfattet i nukleotider 321-2186 av

EP 3722434

SEQ ID NO: 1 eller i et tilsvarende nukleotidavsnitt i en annen AAV-serotype;
og/eller

(iii) det i det minste ene AAV-rep-gen ikke omfatter en funksjonell intern p40-
promotor; og/eller

- 5 (iv) hjelperplasmidet ikke omfatter et sammenhengende avsnitt av
utelukkende cap-gen-sekvens på mer enn 60 nukleotider.

7. To-plasmidsystem eller hjelperplasmid ifølge et hvilket som helst av de
foregående krav, hvor:

- 10 (i) hjelperplasmidet omfatter i det minste ett hjelpervirusgen og det i det
minste ene hjelpervirusgen omfatter en viral assosiert (VA) nukleinsyre, et
E2A-gen og et E4-gen; og/eller

- (ii) hjelperplasmidet omfatter i det minste ett hjelpervirusgen og det i det
minste ene hjelpervirusgen omfatter en VA-nukleinsyre, et E2A-gen og et E4-
15 gen, og E4-genet befinner seg ikke mellom VA-nukleinsyren og E2A-genet;
og/eller

(iii) hjelperplasmidet omfatter i det minste ett hjelpervirusgen, og
hjelperplasmidet er mellom 12000 bp og 15000 bp langt; og/eller

- (iv) hjelperplasmidet ikke omfatter en sammenhengende sekvens av i det
20 minste 3000 nukleotider av et sammenhengende nukleotidavsnitt av
tilsvarende lengde som er omfattet i nukleotider 194-3620 av SEQ ID NO: 2
eller et tilsvarende nukleotidavsnitt i en annen adenovirusserotype; og/eller

- (v) hjelperplasmidet ikke omfatter en sammenhengende sekvens av i det
minste 60 nukleotider av et sammenhengende nukleotidavsnitt av tilsvarende
25 lengde som er omfattet i nukleotider 4032-4100 av SEQ ID NO: 2 eller et
tilsvarende nukleotidavsnitt i en annen adenovirusserotype; og/eller

- (vi) hjelperplasmidet ikke omfatter en sammenhengende sekvens av i det
minste 350 nukleotider av et sammenhengende nukleotidavsnitt av
tilsvarende lengde som er omfattet i nukleotider 4051-4413 av SEQ ID NO: 1
30 eller et tilsvarende nukleotidavsnitt i en annen AAV-serotype.

8. To-plasmidsystem eller hjelperplasmid ifølge et hvilket som helst av de
foregående krav, hvor:

EP 3722434

- (i) hjelperplasmidet ikke omfatter en sammenhengende sekvens av i det minste 600 nukleotider av et sammenhengende nukleotidavsnitt av tilsvarende lengde som er omfattet i nukleotider 2301-2947 av SEQ ID NO: 1 eller et tilsvarende nukleotidavsnitt i en annen AAV-serotype; og/eller
- 5 (ii) hjelperplasmidet omfatter i det minste ett hjelpervirusgen og det i det minste ene hjelpervirusgen omfatter en VA-nukleinsyre, et E2A-gen og et E4-gen, og VA-nukleinsyren, E2A-genet og E4-genet er omfattet i en sammenhengende del på færre enn 10000 nukleotider; og/eller
- 10 (iii) hjelperplasmidet ikke omfatter en sammenhengende sekvens av i det minste 22000 nukleotider av et sammenhengende nukleotidavsnitt av tilsvarende lengde som er omfattet i nukleotider 10619-32756 av SEQ ID NO: 2 eller et tilsvarende nukleotidavsnitt i en annen adenovirusserotype; og/eller
- 15 (iv) hjelperplasmidet og/eller vektorplasmidet ikke omfatter et kunstig Rep-bindingsted.

- 9.** To-plasmidsystem eller hjelperplasmid ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor hjelperplasmidet omfatter i det minste ett hjelpervirusgen og det i det minste ene hjelpervirusgen er omfattet i et sammenhengende avsnitt av
- 20 plasmidet som har i det minste 98% identitet med den fulle lengde eller med et fragment med en lengde på i det minste 8000 nukleotider av SEQ ID NO: 4.

- 10.** To-plasmidsystem ifølge et hvilket som helst av kravene 2-9, hvor:

- 25 (i) vektorplasmidet omfatter i det minste én AAV-cap-gen-promotor, som omfatter en AAV-p40-promotor, en p5-promotor og en p19-promotor; og/eller
- (ii) vektorplasmidet ikke omfatter noen overflødige translasjon-startkodoner; og/eller
- (iii) vektorplasmidet omfatter en promotorregion omfattende én eller flere promotorer, og i promotorregionen:
- 30 (a) mangler nukleotider svarende til nukleotider 321-323 av SEQ ID NO: 1;
- (b) er nukleotider svarende til nukleotider 766-768 av SEQ ID NO: 1 ikke ATG;
- (c) mangler nukleotider svarende til nukleotider 955-957 av SEQ ID NO: 1;

EP 3722434

- (d) mangler nukleotider svarende til nukleotider 993-995 av SEQ ID NO: 1;
og
- (e) mangler nukleotider svarende til nukleotider 1014-1016 av SEQ ID NO: 1;
og/eller
- 5 (iv) vektorplasmidet omfatter en ryggrad med en lengde på mindre enn 3000 nukleotider.

11. To-plasmidsystem ifølge krav 10(iii)(b), hvor nukleotider svarende til 766-768 av SEQ ID NO: 1 er ATT.

10

12. Fremgangsmåte for fremstilling av et rekombinant AAV-preparat, omfattende:

- (a) å oppnå to-plasmidsystemet, hjelperplasmidet eller vektorplasmidet som definert i et hvilket som helst av kravene 1-11;
- (b) å transfektere en vertscelle med to-plasmidsystemet, hjelperplasmidet
15 eller vektorplasmidet som definert i et hvilket som helst av kravene 1-11; og
- (c) å dyrke vertscellen under betingelser som egner seg for rekombinant AAV-produksjon.

13. Fremgangsmåte ifølge krav 12:

- 20 (i) som videre omfatter et trinn av å høste det rekombinante AAV for å tilveiebringe et rekombinant AAV-preparat; og/eller
- (ii) hvor det rekombinante AAV-preparat omfatter et lavt nivå av replikasjonskompetent AAV (rcAAV); og/eller
- (iii) hvor nivået av rcAAV måles til å være mindre enn 1 rcAAV i
25 10^7 rekombinant AAV, mindre enn 1 rcAAV i 10^9 rekombinant AAV eller mindre enn 1 rcAAV i 10^{10} rekombinant AAV; og/eller
- (iv) hvor det rekombinante AAV-preparat omfatter et lavt nivå av rcAAV og nivået av rcAAV er mindre enn nivået av rcAAV som fremstilles under anvendelse av en ekvivalent fremgangsmåte, med det unntak av
30 vektorplasmidet omfatter både i det minste ett AAV-rep-gen og i det minste ett AAV-cap-gen; og/eller
- (v) som omfatter et trinn av å velge et forhold av hjelperplasmid til vektorplasmid, hvor forholdet av hjelperplasmid til vektorplasmid velges eller

EP 3722434

- justeres til et forhold som gjør det mulig for brukeren å oppnå det ønskede forhold av fulle til samlede partikler eller det høye eller ønskede utbytte av rekombinant AAV-vektor; og/eller
- 5 (vi) hvor forholdet av hjelperplasmid til vektorplasmid velges eller justeres til et forhold som oppnår et maksimalt utbytte av rekombinant AAV med det minimale utbytte av tomme partikler som kan oppnås ved et slikt maksimalt utbytte av rekombinant AAV; og/eller
- 10 (vii) hvor det ønskede forhold av fulle til samlede partikler er et forhold av fulle til samlede partikler som er i det minste 20% eller i det minste 30% av forholdet av fulle til samlede partikler som oppnås under anvendelse av en ekvivalent fremgangsmåte med et forhold av hjelperplasmid til vektorplasmid på 1,8:1; og/eller
- (viii) som videre omfatter et trinn av å rense det rekombinante AAV.