



(12) Translation of
european patent specification

(11) NO/EP 2164961 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/09 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2015.06.15
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2015.01.07
(86)	European Application Nr.	08757277.2
(86)	European Filing Date	2008.06.25
(87)	The European Application's Publication Date	2010.03.24
(30)	Priority	2007.06.25, US, 937112 P 2008.03.12, US, 69057 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
(73)	Proprietor	ESBATEch, an Alcon Biomedical Research Unit LLC, Wagistrasse 21, 8952 Schlieren, CH-Sveits
(72)	Inventor	BORRAS, Leonardo, Bundentalstrasse 1, CH-8952 Schlieren, CH-Sveits URECH, David, Schreinerweg 5, CH-8708 Männedorf, CH-Sveits
(74)	Agent or Attorney	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Title	SEKVENSBASERT KONSTRUKSJON OG OPTIMALISERING AV ENKELTKJEDEANTISTOFFER
(56)	References Cited:	WO-A-01/48017 WO-A-03/008451 MONSELLIER E ET AL: "Improving the Stability of an Antibody Variable Fragment by a Combination of Knowledge-based Approaches: Validation and Mechanisms" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 362, no. 3, 22 September 2006 (2006-09-22), pages 580-593, XP024951393 ISSN: 0022-2836 [retrieved on 2006-09-22] POMMIÉ CHRISTELLE ET AL: "IMGT standardized criteria for statistical analysis of immunoglobulin V-REGION amino acid properties." JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION : JMR 2004 JAN-FEB, vol. 17, no. 1, January 2004 (2004-01), pages 17-32, XP002516734 ISSN: 0952-3499 DÉRET S ET AL: "SUBIM: a program for analysing the Kabat database and determining the variability subgroup of a new immunoglobulin sequence." COMPUTER APPLICATIONS IN THE BIOSCIENCES : CABIOS AUG 1995, vol. 11, no. 4, August 1995 (1995-08), pages 435-439, XP009112207 ISSN: 0266-7061 JOHNSON GEORGE ET AL: "The Kabat database and a bioinformatics example." METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (CLIFTON, N.J.) 2004, vol. 248, 2004, pages 11-25, XP009112204 ISSN: 1064-3745 EWERT S ET AL: "STRUCTURE-BASED IMPROVEMENT OF THE BIOPHYSICAL PROPERTIES OF IMMUNOGLOBULIN VH DOMAINS WITH A GENERALIZABLE APPROACH"

BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, EASTON, PA.; US, vol. 42, no. 6, 18 February 2003 (2003-02-18), pages 1517-1528, XP008052212 ISSN: 0006-2960

KNAPPIK A ET AL: "Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 296, no. 1, 11 February 2000 (2000-02-11), pages 57-86, XP004461525 ISSN: 0022-2836

HONEGGER A ET AL: "Yet Another Numbering Scheme for Immunoglobulin Variable Domains: An Automatic Modeling and Analysis Tool" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 309, no. 3, 8 June 2001 (2001-06-08), pages 657-670, XP004626893 ISSN: 0022-2836

WORN A ET AL: "Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 305, no. 5, 2 February 2001 (2001-02-02), pages 989-1010, XP004465987 ISSN: 0022-2836

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

5 **1.** Fremgangsmåte for å identifisere én eller flere aminosyrerester for substitusjon i en bestemt posisjon i en immunbinder, der fremgangsmåten omfatter:

a) å tilveiebringe en første database med V_H - og/eller V_L -aminosyresekvenser gruppert i henhold til undertype;

10 b) å tilveiebringe en andre database med V_H - og/eller V_L -aminosyresekvenser gruppert i henhold til undertype og valgt ut fra å ha minst én ønskelig funksjonell egenskap, hvori den ønskelige funksjonelle egenskapen er forbedret stabilitet, forbedret løselighet, ikke-aggregering, en forbedring i uttrykking, og/eller en forbedring i refoldingsutbytte;

15 c) å bestemme aminosyrefrekvens for en aminosyrerest ved en rammeverkposisjon til den første databasen og ved en korresponderende rammeverkposisjon til den andre databasen;

d) å bestemme anrikingsfaktoren ($RF2:RF1$) til aminosyren ved å bygge forholdet mellom den relative frekvensen til en rest i den andre databasen ($RF2$) og den relative frekvensen til en rest i den første databasen ($RF1$)

e) å identifisere aminosyreresten

20 (i) som en foretrukket aminosyrerest for substitusjon ved den korresponderende aminosyreposisjonen til immunbinderen når aminosyren har en anrikingsfaktor på mer enn 1, eller

25 (i) som en aminosyrerest som skal ekskluderes ved den korresponderende aminosyreposisjonen til immunbinderen når aminosyreresten har en anrikingsfaktor på mindre enn 1.

2. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori aminosyreresten i trinn d) har en anrikingsfaktor på 4 til 6.

30 **3.** Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori den første databasen omfatter "germline" V_H -, V_L - eller V_H - og V_L -aminosyresekvenser.

35 **4.** Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–3, hvori den første databasen består av "germline" V_H -, V_L - eller V_H - og V_L -aminosyresekvenser.

5. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori den første databasen omfatter modne V_H -, V_L - eller V_H - og V_L -aminosyresekvenser.

5 **6.** Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–5, hvori den første databasen består av modne V_H -, V_L - eller V_H - og V_L -aminosyresekvenser.

7. Fremgangsmåten ifølge krav 5 eller 6, hvori de modne V_H -, V_L - eller V_H - og V_L -aminosyresekvensene er fra Kabat-databasen (KDB).

10

8. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori den andre databasen omfatter scFv-antistoff V_H -, V_L - eller V_H - og V_L -aminosyresekvenser valgt fra en QC-assay.

15

9. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–7, hvori den andre databasen består av scFv-antistoff V_H -, V_L - eller V_H - og V_L -aminosyresekvenser valgt fra en QC-assay.

20

10. Fremgangsmåte for å forbedre en immunbinder, der immunbinderen har V_H - og/eller V_L -aminosyresekvenser, der fremgangsmåten omfatter:

a) å identifisere én eller flere rammeverk-aminosyreposisjoner for mutasjon;
b) å identifisere for hver enkelt rammeverkposisjon som identifisert i trinn a) en foretrukket aminosyrerest for substitusjon i henhold til fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9; og

25

c) å mutere aminosyreresten ved hver enkelt rammeverkposisjon mot den foretrukne aminosyreresten identifisert i trinn b)

hvor i trinn a) utføres ved å tilordne en konserveringsgrad til hver rammeverkposisjon ved bruk av Simpson-indeks, og Simpson-indeksen for aminosyreposisjonen i den andre databasen er minst 0,01 mindre enn Simpson-indeksverdien til den korresponderende aminosyreposisjonen i den første databasen.

30

11. Fremgangsmåten ifølge krav 10, hvori hvis aminosyreresten som er valgt for mutasjon, er en tungkjede-aminosyrerest, er den ved en posisjon valgt fra gruppen bestående av 1, 6, 7, 10, 12, 13, 14, 19, 20, 21, 45, 47, 50, 55, 77, 78, 82, 86, 87, 89, 90, 92, 95, 98, 103 og 107 ved bruk av AHo-nummerering (aminosyreposisjon 1, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 18, 19, 20, 38, 40, 43, 48, 66, 67, 71,

35

75, 76, 78, 79, 81, 82b, 84, 89 og 93 ved bruk av Kabat-nummerering), og hvori hvis aminosyreresten valgt for mutasjon er en lettkjede-aminosyrerest, er den ved en posisjon valgt fra gruppen bestående av 1, 2, 3, 4, 7, 10, 11, 12, 14, 18, 20, 24, 46, 47, 50, 53, 56, 57, 74, 82, 91, 92, 94, 101 og 103 ved bruk av AHo-nummerering (aminosyreposisjon 1, 2, 3, 4, 7, 10, 11, 12, 14, 18, 20, 24, 38, 39, 42, 45, 48, 49, 58, 66, 73, 74, 76, 83 og 85 ved bruk av Kabat-nummerering).

12. Fremgangsmåten ifølge krav 11, hvori immunbinderen omfatter en VH3 tungkjede variabel region og den ene eller de flere aminosyreposisjonene valgt for mutasjon er valgt fra gruppen bestående av aminosyreposisjon 1, 6, 7, 89 og 103 av VH3 ved bruk av AHo-nummerering (aminosyreposisjon 1, 6, 7, 78 og 89 ved bruk av Kabat-nummerering).

13. Fremgangsmåten ifølge krav 11, hvori immunbinderen omfatter en VH1a tungkjede variabel region og den ene eller de flere aminosyreposisjonene valgt for mutasjon er valgt fra gruppen bestående av aminosyreposisjon 1, 6, 12, 13, 14, 19, 21, 90, 92, 95 og 98 av VH1a ved bruk av AHo-nummerering (aminosyreposisjon 1, 6, 11, 12, 13, 18, 20, 79, 81, 82b og 84 ved bruk av Kabat-nummerering).

14. Fremgangsmåten ifølge krav 11, hvori immunbinderen omfatter en VH1b tungkjede variabel region og den ene eller de flere aminosyreposisjonene valgt for mutasjon er valgt fra gruppen bestående av aminosyreposisjon 1, 10, 12, 13, 14, 20, 21, 45, 47, 50, 55, 77, 78, 82, 86, 87 og 107 av VH1b ved bruk av AHo-nummerering (aminosyreposisjon 1, 9, 11, 12, 13, 19, 20, 38, 40, 43, 48, 66, 67, 71, 75, 76 og 93 ved bruk av Kabat-nummerering).

15. Fremgangsmåten ifølge krav 11, hvori immunbinderen omfatter en Vκ1 lettkjede variabel region og den ene eller de flere aminosyreposisjonene valgt for mutasjon er valgt fra gruppen bestående av aminosyreposisjon 1, 3, 4, 24, 47, 50, 57, 91 og 103 av VK1 ved bruk av AHo-nummerering (aminosyreposisjon 1, 3, 4, 24, 39, 42, 49, 73 og 85 ved bruk av Kabat-nummerering).

16. Fremgangsmåten ifølge krav 11, hvori immunbinderen omfatter en Vκ3 lettkjede variabel region og den ene eller de flere aminosyreposisjonene valgt for mutasjon er valgt fra gruppen bestående av aminosyreposisjon 2, 3, 10, 12, 18,

20, 56, 74, 94, 101 og 103 av Vκ3 ved bruk av AHo-nummerering (aminosyreposisjon 2, 3, 10, 12, 18, 20, 48, 58, 76, 83 og 85 ved bruk av Kabat-nummerering).

5 **17.** Fremgangsmåten ifølge krav 11, hvori den ene eller de flere aminosyreposisjonene valgt for mutasjon er valgt fra gruppen bestående av aminosyreposisjon 1, 2, 4, 7, 11-, 14, 46, 53, 82, 92 og 103 av Vλ1 ved bruk av AHo-nummerering (aminosyreposisjon 1, 2, 4, 7, 11, 14, 38, 45, 66, 74 og 85 ved bruk av Kabat-nummerering).

10 **18.** Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 11–17, hvori muteringen ytterligere omfatter én eller flere (fortrinnsvis alle) kjedesubstitusjoner av en tungkjede-aminosyreposisjon valgt fra gruppen bestående av aminosyreposisjon 12, 13 og 144 ved bruk av AHo-nummerering
15 (aminosyreposisjon 12, 85 og 103 ved bruk av Kabat-nummerering).

20 **19.** Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 11–18, hvori den ene eller de flere aminosyreposisjonene valgt for mutasjon muteres til en aminosyrerest funnet ved en korresponderende aminosyreposisjon i en antistoffsekvens valgt fra en QC-assay.

25 **20.** Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–19, hvori immunbinderen er et scFv-antistoff, et fullengde immunglobulin, et Fab-fragment, en Dab eller en Nanobody.

30 **21.** Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–9 eller 11–20, hvori den funksjonelle egenskapen er forbedret stabilitet, forbedret løselighet, ikke-aggregering, en forbedring i uttrykking, en forbedring i refoldingsutbytte etterfølgende en inklusjonslegemerenseprosess eller en kombinasjon av to eller flere av forbedringene.

35 **22.** Fremgangsmåten ifølge krav 21, hvori forbedringen i uttrykking observeres i en prokaryotisk celle.

23. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–9 og 21–22, med det forbehold at den funksjonelle egenskapen ikke er en forbedring i antigenbindingsaffinitet.