



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2307455 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 16/22 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2017.08.14
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2017.03.22
(86)	European Application Nr.	09768694.3
(86)	European Filing Date	2009.06.25
(87)	The European Application's Publication Date	2011.04.13
(30)	Priority	2008.06.25, US, 75692 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 MK 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, Widmen 8, 8634 Hombrechtikon, CH-Sveits
(74)	Agent or Attorney	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54) Title **SOLUBILITY OPTIMIZATION OF IMMUNOBINDERS**

(56) References Cited:

US-A1- 2007 031 413
US-B1- 6 815 540
NIEBA L ET AL: "Disrupting the hydrophobic patches at the antibody variable/constant domain interface: Improved in vivo folding and physical characterization of an engineered scFv fragment" PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 10, no. 4, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 435-444, XP002249462 ISSN: 0269-2139
DAVIES J ET AL: "'Camelising' human antibody fragments: NMR studies on VH domains" FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 339, no. 3, 21 February 1994 (1994-02-21), pages 285-290, XP025614903 ISSN: 0014-5793 [retrieved on 1994-02-21]
JUNG S ET AL: "Selection for improved protein stability by phage display" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 294, no. 1, 19 November 1999 (1999-11-19), pages 163-180, XP004461860 ISSN: 0022-2836
FISHER A C ET AL: "Efficient Isolation of Soluble Intracellular Single-chain Antibodies using the Twin-arginine Translocation Machinery" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 385, no. 1, 9 January 2009 (2009-01-09), pages 299-311, XP025846140 ISSN: 0022-2836 [retrieved on 2008-11-01]
DAVIES J ET AL: "SINGLE ANTIBODY DOMAINS AS SMALL RECOGNITION UNITS: DESIGN AND IN VITRO ANTIGEN SELECTION OF CAMELIZED, HUMAN VH DOMAINS WITH IMPROVED PROTEIN STABILITY" PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 9, no. 6, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 531-537, XP000971767 ISSN: 0269-2139
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

1. Immunobinder omfattende én av følgende løselighetsfremmende motiver i aminosyreposisjon 12, 103 og 144 i tungkjeden (AHo-nummerering):

- 5 (a) serin (S) i aminosyreposisjon 12 i tungkjeden;
 (b) serin (S) i aminosyreposisjon 103 i tungkjeden; og
 (c) treonin (T) i aminosyreposisjon 144 i tungkjeden; eller
 (a1) serin (S) i aminosyreposisjon 12 i tungkjeden;
 (b1) treonin (T) i aminosyreposisjon 103 i tungkjeden; og
 10 (c1) serin (S) i aminosyreposisjon 144 i tungkjeden; eller
 (a2) serin (S) i aminosyreposisjon 12 i tungkjeden;
 (b2) treonin (T) i aminosyreposisjon 103 i tungkjeden; og
 (c2) treonin (T) i aminosyreposisjon 144 i tungkjeden.

2. Immunobinderen ifølge krav 1, ytterligere omfattende

- 15 (a) aspartinsyre (D) i aminosyreposisjon 31 i lettkjeden;
 (b) glutaminsyre (E) i aminosyreposisjon 83 i lettkjeden;
 (c) arginin (R) i aminosyreposisjon 43 i tungkjeden;
 (d) leucin (L) i aminosyreposisjon 67 i tungkjeden; og/eller
 20 (e) alanin (A) i aminosyreposisjon 78 i tungkjeden.

3. Fremgangsmåte for å fremme løseligheten til en immunobinder, der immunobinderen omfatter en variabel (V_H) region, eller fragment derav, i tungkjeden, der fremgangsmåten omfatter:

- 25 A) å velge minst tre aminosyreposisjoner i V_H -regionen for mutasjon; og
 B) å mutere de minst tre aminosyreposisjonene valgt for mutasjon,
 hvori de minst tre aminosyreposisjonene er aminosyreposisjon 12, 103 og 144 i tungkjeden (ifølge AHo-nummereringskonvensjon), og muteringen omfatter substitueringen fra aminosyrene i de valgte aminosyreposisjonene til en hydrofil aminosyre.
 30

4. Fremgangsmåten ifølge krav 3, hvori den hydrofile aminosyren er

- (a) serin (S) i aminosyreposisjon 12 i tungkjeden;
 (b) serin (S) eller treonin (T) i aminosyreposisjon 103 i tungkjeden; og/eller
 35 (c) serin (S) eller treonin (T) i aminosyreposisjon 144 i tungkjeden.

- 5.** Fremgangsmåten ifølge krav 3 eller 4, hvori aminosyren i aminosyreposisjonen valgt til mutasjon er en hydrofob aminosyre.
- 5 **6.** Fremgangsmåten ifølge krav 5, hvori den hydrofile aminosyren er leucin (L) eller valin (V).
- 7.** Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 3 til 6, hvori aminosyren valgt til mutasjon av
- 10 (a) aminosyren i aminosyreposisjon 12 i tungkjeden er valin (V);
 (b) aminosyren i aminosyreposisjon 103 i tungkjeden er valin (V); og
 (c) aminosyren i aminosyreposisjon 144 i tungkjeden er leucin (L).
- 8.** Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 3 til 7, hvori termisk stabilitet, refolding, ekspresjonsutbytte, aggregering og/eller bindingsaktivitet til
- 15 immunobinderen ikke påvirkes negativt av muteringen.
- 9.** Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 3 til 8, hvori muteringen resulterer i en minst 2-folds økning i løselighet.
- 20 **10.** Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 3 til 9, hvori muteringen ytterligere omfatter trinnet med å føre inn én eller flere muteringer i en aminosyreposisjon (AHo-nummereringskonvensjon) valgt fra gruppen bestående av:
- 25 (a) aspartinsyre (D) i aminosyreposisjon 31 i lettkjeden;
 (b) glutaminsyre (E) i aminosyreposisjon 83 i lettkjeden;
 (c) arginin (R) i aminosyreposisjon 43 i tungkjeden;
 (d) leucin (L) i aminosyreposisjon 67 i tungkjeden; og
 (e) alanin (A) i aminosyreposisjon 78 i tungkjeden.
- 30 **11.** Immunobinder fremstilt ifølge fremgangsmåten i et hvilket som helst av kravene 3 til 10.
- 12.** Immunobinderen ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2 eller 11, som er et scFv-antistoff, et fullengde immunglobulin, et Fab-fragment, et Dab eller en
- 35 Nanobody.

13. Immunobinderen ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2, 11 eller 12, hvori immunobinderen spesifikt binder til human TNV α eller human VEGF.

5 **14.** Sammensetning omfattende immunobinderen ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2, 11, 12 eller 13 og en farmasøytisk akseptabel bærer.