



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2307458 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
C07K 16/22 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2018.09.17
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2018.04.11
(86)	European Application Nr.	09768695.0
(86)	European Filing Date	2009.06.25
(87)	The European Application's Publication Date	2011.04.13
(30)	Priority	2009.06.02, CH, 8322009 2008.06.25, US, 75692 P 2008.06.25, US, 75697 P 2009.02.24, US, 155041 P 2009.02.24, US, 155105 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, 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	HUMANIZATION OF RABBIT ANTIBODIES USING A UNIVERSAL ANTIBODY FRAMEWORK
(56)	References Cited:	ROCHA R ET AL: "Rabbit monoclonal antibodies show higher sensitivity than mouse monoclonals for estrogen and progesterone receptor evaluation in breast cancer by immunohistochemistry" PATHOLOGY RESEARCH AND PRACTICE, GUSTAV FISCHER, STUTTGART, DE, vol. 204, no. 9, September 2008 (2008-09), pages 655-662, XP024098831 ISSN: 0344-0338 [retrieved on 2008-06-18], WO-A-2007/140371, WO-A-2008/006235, WO-A2-2008/118356, 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 cited in the application, OTTIGER MICHAEL ET AL: "Efficient intraocular penetration of topical anti-TNF-alpha single-chain antibody (ESBA105) to anterior and posterior segment without penetration enhancer" INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE, ASSOCIATION FOR RESEARCH IN VISION AND OPHTHALMOLOGY, US, vol. 50, no. 2, 1 February 2009 (2009-02-01), pages 779-786, XP009116265 ISSN: 0146-0404, WO-A-2007/001851, WO-A-2008/004834, WO-A2-2007/042809, EWERTS 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, WO-A2-2007/042775, EWERTS ET AL: "Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering" METHODS : A COMPANION TO METHODS IN ENZYMOLOGY, ACADEMIC PRESS INC., NEW YORK, NY, US, vol. 34, no. 2, 1 October 2004 (2004-10-01), pages 184-199, XP004526805 ISSN: 1046-2023, JUNG S ET AL: "IMPROVING IN VIVO FOLDING AND STABILITY OF A SINGLE-CHAIN FV ANTIBODY FRAGMENT BY LOOP GRAFTING" PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 10, no. 8, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 959-966, XP000971779 ISSN: 0269-2139, KÜGLER MARKUS ET AL: "Stabilization and humanization of a single-chain Fv antibody fragment specific for human lymphocyte antigen CD19 by designed point mutations and CDR-grafting onto a human framework." PROTEIN ENGINEERING, DESIGN & SELECTION : PEDS MAR 2009, vol. 22, no. 3, March 2009 (2009-03), pages 135-147, XP002575212 ISSN: 1741-0134, EP-A- 1 918 302, WO-A-2007/124610, WO-A2-2005/035575, 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 cited in the application, POPKOV M ET AL: "Rabbit Immune Repertoires as Sources for Therapeutic Monoclonal Antibodies: The Impact of Kappa Allotype-correlated Variation in Cysteine Content on Antibody Libraries Selected by Phage Display" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 325, no. 2, 10 January 2003 (2003-01-10), pages 325-335, XP004457536 ISSN: 0022-2836, FURRER ESTHER ET AL: "Pharmacokinetics and posterior segment biodistribution of ESBA105, an anti-TNF-alpha single-chain antibody, upon topical administration to the rabbit" INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE, ASSOCIATION FOR RESEARCH IN VISION AND OPHTHALMOLOGY, US, vol. 50, no. 2, 1 February 2009 (2009-02-01), pages 771-778, XP009116264 ISSN: 0146-0404 [retrieved on 2008-08-29], WO-A-2006/131013, WO-A-2007/047112

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.** Akseptorstruktur for å transplantere haredyr-CDR-er omfattende en struktur til en human variabel tungkjede med minst 95 % identitet med SEQ ID NO. 4 og som omfatter treonin (T) i posisjon 24, alanin (A) eller glysin (G) i posisjon 56, treonin (T) i posisjon 84, valin (V) i posisjon 89 og arginin (R) i posisjon 108 (AHO-nummerering).
- 10 **2.** Akseptorstrukturen ifølge krav 1, hvori strukturen til den variable tungkjeden er valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO. 4 og SEQ ID NO. 6.
- 15 **3.** Akseptorstrukturen ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, ytterligere omfattende en struktur til en variabel lettkjede med minst 85 % identitet med sekvensen til SEQ ID NO. 2.
- 20 **4.** Akseptorstrukturen ifølge krav 3, omfattende et treonin (T) i posisjon 87 i strukturen til den variable lettkjeden (AHO-nummerering).
- 5.** Akseptorstrukturen ifølge krav 3, ytterligere omfattende lettkjede CDR1, CDR2 og CDR3 fra et antigenbindende polypeptid til et donorharedyr.
- 25 **6.** Akseptorstrukturen ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori den variable tungkjedens struktur og den variable lettkjedens struktur er forbundet via en linker med SEQ ID NO. 8.
- 7.** Akseptorstrukturen ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, omfattende en struktur med minst 70 % identitet med SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.5 eller SEQ ID NO. 7.
- 30 **8.** Akseptorstruktur til en human eller humanisert variabel tungkjede for å transplantere CDR-er omfattende minst fire aminosyrer i gruppen bestående av treonin (T) i posisjon 24, valin (V) i posisjon 25, alanin (A) eller glysin (G) i posisjon 56, lysin (K) i posisjon 82, treonin (T) i posisjon 84, valin (V) i posisjon 89 og arginin (R) i posisjon 108 (AHO-nummerering), hvori akseptorstrukturen har
- 35 minst 95 % identitet med SEQ ID NO. 4.

9. Akseptorstrukturen ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori aminosyren i posisjon 12, 103 og/eller 144 (AHO-nummerering) ble substituert mot en hydrofil aminosyre.

5 **10.** Akseptorstrukturen ifølge krav 9, med
(a) serin (S) i posisjon 12,
(b) serin (S) eller treonin (T) i posisjon 103 og/eller
(c) serin (S) eller treonin (T) i posisjon 144 (AHO-nummerering) i strukturen til den variable tungkjeden.

10 **11.** Akseptorstrukturen ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, med glutaminsyre (E) i posisjon 1, valin (V) i posisjon 3, leucin (L) i posisjon 4, serin (S) i posisjon 10; arginin (R) i posisjon 47, serin (S) i posisjon 57, fenyylalanin (F) i posisjon 91 og/eller valin (V) i posisjon 103 i strukturen til den variable lett-kjeden (AHO- nummerering).

15 **12.** Akseptorstrukturen ifølge krav 11, ytterligere omfattende donorstrukturester involvert i antigenbinding.

20 **13.** Akseptorstrukturen ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, ytterligere omfattende glysin (G) i posisjon 141 til den variable lett-kjeden (AHO-nummerering).

25 **14.** Anvendelse av akseptorstrukturen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 13 for transplantasjon av haredyr-CDR-er.

15. Antigenbindende polypeptid, omfattende akseptorstrukturen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 13.

30 **16.** Det antigenbindende polypeptidet ifølge krav 15, som er et scFv-antistoff.

35 **17.** Det antigenbindende polypeptidet ifølge et hvilket som helst av kravene 15 til 16, ytterligere omfattende ett eller flere festede molekyler, særlig et terapeutisk middel slik som et cytotoxisk middel, et cytokin, et kjemokin, en vekstfaktor eller annet signaleringsmolekyl, et avbildningsmiddel eller et andre protein, særlig en transkripsjonell aktivator eller et DNA-bindende domene.

18. Det antigenbindende polypeptidet ifølge et hvilket som helst av kravene 15-17 for anvendelse i diagnostiske anvendelser, terapeutiske anvendelser, målvalidering og genterapi.

5 **19.** Nukleinsyre, særlig omfattende en isolert nukleinsyre, som koder for akseptorstrukturen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 13, eller det antigenbindende polypeptidet ifølge et hvilket som helst av kravene 15 til 17.

20. Vektor omfattende nukleinsyren ifølge krav 19.

10

21. Vertscelle omfattende vektoren ifølge krav 20.

22. Nukleinsyren ifølge krav 19 eller vektoren ifølge krav 20 for anvendelse i genterapi.

15

23. Sammensetning omfattende akseptorstrukturen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 13, det antigenbindende polypeptidet ifølge et hvilket som helst av kravene 15 til 17, nukleinsyren ifølge krav 19 eller vektoren ifølge krav 20.

20

24. Fremgangsmåte for å humanisere et antigenbindende polypeptid til en kanin, der det antigenbindende polypeptidet til en kanin omfatter tungkjede CDR1-, CDR2- og CDR3-sekvenser og/eller lettkjede CDR1-, CDR2- og CDR3-sekvenser, idet fremgangsmåten omfatter:

25

(i) å transplantere minst én tungkjede CDR i gruppen bestående av CDR H1-, CDR H2- og CDR H3-sekvenser inn i en human variabel tungkjede-struktur som har minst 95 % identitet med SEQ ID NO. 4, ytterligere omfattende minst seks aminosyrer i gruppen bestående av treonin (T) i posisjon 24, valin (V) i posisjon 25, alanin (A) eller glysin (G) i posisjon 56, lysin (K) i posisjon 82, treonin (T) i posisjon 84, valin (V) i posisjon 89 og arginin (R) i posisjon 108 (AHO-nummerering), og

30

(ii) å transplantere minst én lettkjede CDR i gruppen bestående av CDR H1-, CDR H2- og CDR H3-sekvenser inn i en akseptorstruktur til en human variabel lettkjede, der strukturen i den humane variable lettkjeden har minst 85 % identitet med SEQ ID NO:2.

35

25. Fremgangsmåten ifølge krav 24, hvori

- (i) strukturen til en human variabel tungkjede omfatter strukturens aminosyresekvens med SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4 eller SEQ ID NO:6; og
- (i) strukturen til den humane variable lettkjeden omfatter strukturens aminosyresekvens med SEQ ID NO:2 eller SEQ ID NO:9.

5

26. Fremgangsmåten ifølge krav 24 eller 25, ytterligere omfattende å substituere strukturetter med strukturetter av det antigenbindende polypeptidet til kanin, som er involvert i antigenbinding.

10

27. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 24 til 26, ytterligere omfattende trinnet med å substituere en strukturetter av akseptorstrukturen til en variabel tungkjede med en - substitusjon i minst én av tungkjedeaminoposisjonene 12, 103 og 144 (AHO-nummerering), særlig ved å substituere mot en hydrofil aminosyre, foretrukket ved en substitusjon valgt fra gruppen bestående av: (a) serin (S) i posisjon 12; (b) treonin (T) i posisjon 103; og (c) treonin (T) i posisjon 144.

15

20

28. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 24-27, ytterligere omfattende å substituere en strukturetter av akseptorstrukturen til en variabel lettkjede med en stabilitetsfremmende substitusjon i minst én av posisjonene 1, 3, 4, 10, 47, 57, 91 og 103 i den variable regionen i lettkjeden ifølge AHO-nummereringssystemet, særlig med en substitusjon valgt fra gruppen bestående av (a) glutaminsyre (E) i posisjon 1, (b) valin (V) i posisjon 3, leucin i (L) i posisjon 4; serin (S) i posisjon 10; arginin (R) i posisjon 47; serin (S) i posisjon 57; fenylalanin (F) i posisjon 91; og/eller valin (V) i posisjon 103.

25

29. Antigenbindende polypeptid humanisert ifølge fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 24-28.

30

30. Det antigenbindende polypeptidet ifølge krav 29, hvori målantigenet er VEGF eller TNFα.

35

31. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 24 til 28, hvori fremgangsmåten ytterligere omfatter identifisering av donor-CDR-er til et antistoffs variable domene generert av B-celler ifølge trinnene

- a) å inkubere kanin-B-celler med et målantigen;
- b) å velge de B-cellene som binder til målantigenet; og

c) å identifisere CDR-ene til antistoffets variable domene generert av B-cellene.

32. Fremgangsmåten ifølge krav 31, hvori B-cellene isoleres fra en kanin som er immunisert mot målantigenet, foretrukket ved DNA-vaksinasjon.

5

33. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 31 eller 32, hvori B-cellene og målantigenet er farget ulikt, og samtidig forekomst av de to fargene er positivt valgt ved strømningscytometribasert enkeltcellesortering.

10

34. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 31-33, hvori målantigenet er et oppløselig protein.

15

35. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 31-33, hvori målantigenet uttrykkes på overflaten til en celle, særlig hvori målantigenet er et transmembranprotein, særlig et protein som spenner over flere membraner.

20

36. Fremgangsmåten ifølge krav 35, hvori målantigenet farges indirekte ved å farge cellen som uttrykker målantigenet med et intracellulær fluorescerende fargemiddel.

37. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 31-36, hvori B-cellene farges med ett eller flere merkede antistoffer som er spesifikke for B-celleoverflatemarkører.

25

38. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 31-37, hvori B-celler farges med merkede anti-IgG-antistoffer.

39. Fremgangsmåten ifølge krav 38, hvori B-celler farges med merkede anti-IgG-antistoffer og med ulikt merkede anti-IgM-antistoffer.

30

40. Fremgangsmåten ifølge krav 39, hvori B-cellene som farges med merkede anti-IgG-antistoffer, velges negativt.

35

41. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 31-40, ytterligere omfatter trinnet med å dyrke B-cellene valgt i trinn b) ifølge krav 31, slik at de genererte antistoffene sekreteres inn i dyrkingsmediet, særlig i nærvær av en hjelpecellelinje.

- 42.** Fremgangsmåten ifølge krav 41, ytterligere omfattende trinnet med å teste de sekreterte antistoffene for spesifikk binding til målantigenet.
- 5 **43.** Fremgangsmåten ifølge krav 42, hvori antistoffenes CDR-er amplifiseres, særlig ved hjelp av RT-PCR, og transplanteres inn i en akseptorstruktur for å frembringe et antigenbindende polypeptid som deretter testes for spesifikk binding til målantigenet.
- 10 **44.** Anvendelse av en akseptorstruktur til en human variabel tungkjede omfattende en sekvens med minst 95 % identitet med SEQ ID NO. 4, ytterligere omfattende minst seks aminosyrer i gruppen bestående av treonin (T) i posisjon 24, valin (V) i posisjon 25, alanin (A) eller glysin (G) i posisjon 56, lysin (K) i posisjon 82, treonin (T) i posisjon 84, valin (V) i posisjon 89 og arginin (R) i posisjon 108 (AHo-nummerering) og en akseptorstruktur til en human variabel lett kjede omfattende en sekvens med minst 85 % identitet med SEQ ID NO. 2, for transplantasjon av kanin-CDR-er.
- 15
- 45.** Anvendelsen ifølge krav 44, hvori strukturen omfatter SEQ ID NO. 1 og SEQ ID NO. 2, begge forbundet via en linker med SEQ ID NO. 8.
- 20
- 46.** Farmasøytisk sammensetning omfattende det antigenbindende polypeptidet ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, formulert for topisk, oral, nasal, intracerebrospinal, rektal eller parenteral administrering.
- 25
- 47.** Formulering omfattende en akseptorstruktur ifølge et hvilket som helst av kravene 1-13 eller det antigenbindende polypeptidet ifølge krav 29 eller 30, for anvendelse som medikament, **karakterisert ved at** sammensetningen skal administreres intramuskulært, intraperitonealt, intracerebrospinalt, subkutant, intraartikulært, intrasynovialt, intratekalt, oralt, topisk eller ved inhalasjon.
- 30