



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2440228 B1

NORWAY

(19) NO

(51) Int Cl.

A61K 38/22 (2006.01)

A61K 38/27 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61P 3/08 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

C07K 14/46 (2006.01)

C07K 14/575 (2006.01)

C07K 14/605 (2006.01)

C07K 14/61 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2019.02.11
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2018.09.26
(86)	European Application Nr.	10786730.1
(86)	European Filing Date	2010.06.08
(87)	The European Application's Publication Date	2012.04.18
(30)	Priority	2009.06.08, US, 268193 P 2009.08.25, US, 236836 P 2009.11.10, US, 280955 P 2010.02.03, US, 699761 2010.02.03, WO, PCT/US10/002310
(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 ; SE ; SI ; SK ; SM ; TR
(73)	Proprietor	Amunix Operating Inc., 500 Ellis Street, Mountain View, CA 94043, USA
(72)	Inventor	SCHELLENBERGER, Volker, 914 Moreno Avenue, Palo Alto, CA 94303, USA SILVERMAN, Joshua, 829 Dartshire Way, Sunnyvale, CA 94087, USA STEMMER, Willem, P., 108 Kathy Court, Los Gatos, CA 95051, USA WANG, Chia-wei, 652 Barto Street, Santa Clara, CA 95051, USA GEETHING, Nathan, 9 Hemlock Lane, Acton, MA 01720, USA CLELAND, Jeffrey. L., 225 Aberdeen Drive, San Carlos, CA 94070, USA SPINK, Benjamin, 379 Northam Avenue, San Carlos, CA 94070, USA
(74)	Agent or Attorney	ZACCO NORWAY AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54) Title **GLUCOSE-REGULATING POLYPEPTIDES AND METHODS OF MAKING AND USING SAME**

(56) References

Cited: WO-A2-2011/123813, CLELAND JEFFREY L ET AL: "A Monthly Dosed GLP-1 Analog for Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus", DIABETES, vol. 59, no. Suppl. 1, 25 June 2010 (2010-06-25), - 29 June 2010 (2010-06-29), page A104, XP002696149, & 70TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION; ORLANDO, FL, USA ISSN: 0012-1797, KOHN, J. E. ET AL.: 'Random-coil behavior and the dimensions of chemically unfolded proteins.' PNAS. vol. 101, no. 34, 24 August 2004, pages 12491 - 12496, XP008157744, WO-A1-2011/028229, US-A1- 2007 212 703, LEE SANG-HEON ET AL: "Synthesis, characterization, and pharmacokinetic studies of PEGylated glucagon-like peptide-1", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 16, no. 2, 23 February 2005 (2005-02-23), pages 377-382, XP002398436, ACS, WASHINGTON, DC, US ISSN: 1043-1802, WO-A1-2011/028228, US-A1- 2007 161 087, ZHOU J ET AL: "Preparation and PEGylation of exendin-4 peptide secreted from yeast *Pichia pastoris*", EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, vol. 72, no. 2, 1 June 2009 (2009-06-01), pages 412-417, XP026119126, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL ISSN: 0939-6411, DOI: 10.1016/J.EJPB.2009.02.001 [retrieved on 2009-02-07], WO-A1-2008/155134, WO-A2-2011/123830, SCHLAPSCHY MARTIN ET AL: "Fusion of a recombinant antibody fragment with a homo-amino-acid polymer: effects on biophysical properties and prolonged plasma half-life", PROTEIN ENGINEERING, DESIGN AND SELECTION, vol. 20, no. 6 26 June 2007 (2007-06-26), pages 273-284, XP002498446, OXFORD JOURNAL, LONDON, GB ISSN: 1741-0126, DOI: 10.1093/PROTEIN/GZM020 Retrieved from the Internet: URL:10.1093/protein/gzm020 [retrieved on 2007-06-26], WO-A1-2010/091122, US-A1- 2006 293 232, HUANG YAN-SHAN ET AL: "Preparation and characterization of a novel exendin-4 human serum albumin fusion protein expressed in *Pichia pastoris*", JOURNAL OF PEPTIDE SCIENCE, vol. 14, no. 5, 1 May 2008 (2008-05-01), pages 588-595, XP002558144, JOHN WILEY AND SONS LTD, GB ISSN: 1075-2617, DOI: 10.1002/PSC.942 [retrieved on 2007-11-12], WO-A2-2011/084808, CLELAND JEFFREY L ET AL: "An Extended Half-Life Glucagon Construct for the Prevention of Nocturnal Hypoglycemia", DIABETES, vol. 58, no. Suppl. 1, 5 June 2009 (2009-06-05), - 9 June 2009 (2009-06-09), page A513, XP002696148, & 69TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION; NEW ORLEANS, LA, USA ISSN: 0012-1797, GEETHING NATHAN C ET AL: "Gcg-XTEN: An Improved Glucagon Capable of Preventing Hypoglycemia without Increasing Baseline Blood Glucose", PLOS ONE, vol. 5, no. 4, E10175, April 2010 (2010-04), pages 1-11, XP002696150, ISSN: 1932-6203, WO-A2-2007/103455, US-A1- 2010 239 554, SCHELLENBERGER VOLKER ET AL: "A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 27, no. 12, 15 November 2009 (2009-11-15), pages 1186-1190+2PP, XP002694466, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.1588, WO-A2-2007/103515, CLELAND JEFFREY L ET AL: "An Extended Half-Life Exenatide Construct for Weekly Administration in the Treatment of Diabetes Mellitus", DIABETES, vol. 58, no. Suppl. 1, 5 June 2009 (2009-06-05), - 9 June 2009 (2009-06-09), pages A511-A512, XP002696147, & 69TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION; NEW ORLEANS, LA, USA ISSN: 0012-1797, PAULA ALVAREZ ET AL: "Improving protein pharmacokinetics by genetic fusion to simple amino acid sequences", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 279, January 2004 (2004-01), pages 3375-3380, XP008131025, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M311356200

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.** Isolert nukleinsyre omfattende en polynukleotidsekvens som koder et fusjonsprotein omfattende et glukoseregulerende peptid (GP),
5 hvori polynukleotidsekvensen (i) omfatter en sekvens som hybridiserer under strenge betingelser med AE864 ifølge tabell 9 (SEQ ID NO: 243) eller Ex4-AE864 ifølge tabell 36 (SEQ ID NO: 897) eller komplementet derav og har minst 70 % sekvensidentitet eller 80 % eller 90 % eller 95 % eller 97 % eller 98 % eller 99 % til 100 % sekvensidentitet med AE864 ifølge tabell 9 (SEQ ID NO: 243) eller Ex4-AE864 ifølge tabell 36 (SEQ ID NO: 897) eller komplementet derav,
10 og (ii) koder et fusjonsprotein omfattende (a) exendin-4 og som har en aminosyresekvens som utviser minst 95 % sekvensidentitet med Ex4-AE864 ifølge tabell 36 (SEQ ID NO: 896) eller (b) GLP-1 og som har en aminosyresekvens som utviser minst 95 % sekvensidentitet med GLP1-AE864 ifølge tabell 36 (SEQ ID NO: 986), og som beholder minst en del av den biologiske aktiviteten til det native GP-et.
- 2.** Den isolerte nukleinsyren ifølge krav 1, hvori det glukoseregulerende peptidet (GP) er minst ca. 90 % eller ca. 95 % identisk med en aminosyresekvens valgt fra
20 exendin-4 ifølge tabell 1 (SEQ ID NO: 4) eller hGLP-1 ifølge tabell 1 (SEQ ID NO: 6) eller humant GLP-1 ifølge tabell 1 (SEQ ID NO: 8).
- 3.** Den isolerte nukleinsyren ifølge krav 1 eller krav 2, hvori fusjonsproteinet, når det administreres til et individ med behov for dette, oppnår en terapeutisk effekt
25 som kan sammenlignes med det tilsvarende GP-et som mangler XTEN-et ved anvendelse av en ellers ekvivalent molmengde, selv når fusjonsproteinet administreres mindre hyppig til et individ sammenlignet med det tilsvarende GP-et som mangler XTEN.
- 4.** Den isolerte nukleinsyren ifølge et hvilket som helst av kravene 1-3, hvori fusjonsproteinet omfatter en polypeptidsekvens av GLP1-AE864 ifølge tabell 36 (SEQ ID NO: 986).
30
- 5.** Den isolerte nukleinsyren ifølge krav 4, hvori fusjonsproteinet omfatter polypeptidsekvensen Ex4-AE864 ifølge tabell 36 (SEQ ID NO: 896).
35

6. Den isolerte nukleinsyren ifølge krav 1, hvori polynukleotidsekvensen omfatter Ex4-AE864 ifølge tabell 36 (SEQ ID NO: 897).

5 **7.** Ekspresjonsvektor omfattende polynukleotidsekvensen ifølge et hvilket som helst av kravene 1-6.

8. Fusjonsprotein omfattende en GP som er minst ca. 90 % eller ca. 95 % identisk med en aminosyresekvens valgt fra exendin-4 ifølge tabell 1 (SEQ ID NO: 4) eller hGLP-1 ifølge tabell 1 (SEQ ID NO: 6) eller humant GLP-1 ifølge tabell 1 (SEQ ID NO: 8),

10 hvori GP-et er bundet til et forlenget rekombinant polypeptid (XTEN) med minst ca. 200 aminosyrerester

for anvendelse i en fremgangsmåte for å behandle en tilstand relatert til et glukoseregulerende peptid hos et individ, der fremgangsmåten omfatter

15 (i) å uttrykke fusjonsproteinet fra et polynukleotid omfattende en sekvens som hybridiserer under strenge betingelser med AE864 ifølge tabell 9 (SEQ ID NO: 243) eller komplementet derav, og har minst 70 % sekvensidentitet eller 80 % eller 90 % eller 95 % eller 97 % eller 98 % eller 99 % til 100 % sekvensidentitet med AE864 ifølge tabell 9 (SEQ ID NO: 243).

20 (ii) å administrere til individet en terapeutisk effektiv mengde av fusjonsproteinet, hvori XTEN-et er **karakterisert ved at:**

(a) XTEN-sekvensen omfatter minst ca. 200 sammenhengende aminosyrer som utviser minst 90 %, minst 95 % sekvensidentitet med aminosyresekvensen AE864 ifølge tabell 5 (SEQ ID NO: 199);

25 (b) XTEN-sekvensen mangler en predikert T-celleepitop når den analyseres ved hjelp av en TEPITOPE-algoritme, hvori TEPITOPE-algoritmeprediksjonen for epitoper i XTEN-sekvensen er basert på en skår på -9 eller mer;

(d) den har en undersekvensskår på mindre enn 10; og

30 (d) summen av glysin- (G-), alanin- (A-), serin- (S-), treonin- (T-), glutamat- (E-) og prolin- (P-)rester utgjør mer enn ca. 90 % av de totale aminosyrerestene til XTEN-et.

9. Anvendelse av et fusjonsprotein omfattende en GP som er minst ca. 90 % eller ca. 95 % identisk med en aminosyresekvens valgt fra exendin-4 ifølge tabell 1 (SEQ ID NO: 4) eller hGLP-1 ifølge tabell 1 (SEQ ID NO: 6) eller humant GLP-1 ifølge tabell 1 (SEQ ID NO: 8),

35

hvor GP-et er bundet til et forlenget rekombinant polypeptid (XTEN) med minst ca. 200 aminosyrerester

i fremstilling av et medikament for å behandle en tilstand relatert til et glukoseregulerende peptid hos et individ,

5 der anvendelsen omfatter

(i) å uttrykke fusjonsproteinet fra et polynukleotid omfattende en sekvens som hybridiserer under strenge betingelser med AE864 ifølge tabell 9 (SEQ ID NO: 243) eller komplementet derav, og har minst 70% sekvensidentitet eller 80% eller 90% eller 95% eller 97% eller 98% eller 99% til 100% sekvensidentitet med AE864 ifølge tabell 9 (SEQ ID NO: 243).

10

(ii) å administrere til individet en terapeutisk effektiv mengde av fusjonsproteinet, hvor XTEN-et er **karakterisert ved at:**

(a) XTEN-sekvensen omfatter minst ca. 200 sammenhengende aminosyrer som utviser minst 90 %, minst 95 % sekvensidentitet med aminosyresekvensen AE864 ifølge tabell 5 (SEQ ID NO: 199);

15

(b) XTEN-sekvensen mangler en predikert T-celleepitop når den analyseres ved hjelp av en TEPITOPE-algoritme, hvor TEPITOPE-algoritmeprediksjonen for epitoper i XTEN-sekvensen er basert på en skår på -9 eller mer;

(d) den har en undersekvensskår på mindre enn 10; og

20

(d) summen av glysin- (G-), alanin- (A-), serin- (S-), treonin- (T-), glutamat- (E-) og prolin- (P-)rester utgjør mer enn ca. 90 % av de totale aminosyrerestene til XTEN-et.

10. Fusjonsproteinet for anvendelse, eller anvendelsen, ifølge krav 8 eller krav 9, hvor GP-et er exendin-4 ifølge tabell 1 (SEQ ID NO: 4).

25

11. Fusjonsprotein for anvendelse, eller anvendelsen, ifølge krav 9 eller 10, hvor: i) administreringen resulterer i lengre terminal halveringstid når dette administreres til et individ sammenlignet med det tilsvarende glukoseregulerende peptidet som mangler XTEN-et når det administreres til et individ i en sammenlignbar moldose; og/eller

30

(ii) fusjonsproteinet oppnår en sammenlignbar terapeutisk effekt som en tilsvarende GP som mangler XTEN-et under anvendelse av en ellers ekvivalent molmengde, selv når fusjonsproteinet administreres mindre hyppig til et individ sammenlignet med det tilsvarende GP-et som mangler XTEN-et.

35

12. Fusjonsprotein for anvendelse, eller anvendelsen, ifølge et hvilket som helst av kravene 8-11, hvori:

i) fusjonsproteinet er kodet av en nukleinsyre omfattende en polynukleotidsekvens omfattende en sekvens som hybridiserer under strenge betingelser til AE864 ifølge tabell 9 (SEQ ID NO: 243) eller komplementet derav, og som har minst 70 % sekvensidentitet eller 80 % eller 90 % eller 95 % eller 97 % eller 98 % eller 99 % til 100 % sekvensidentitet med polynukleotidsekvensen Ex4-AE864 ifølge tabell 36 (SEQ ID NO: 897); og/eller

ii) den terapeutisk effektive mengden resulterer i en økning i oppholdstid i et terapeutisk vindu fastsatt for fusjonsproteinet med minst tre ganger sammenlignet med det tilsvarende GP-et som mangler XTEN-et, når det administrerte fusjonsproteinet og det tilsvarende GP-et som mangler XTEN-et, er i en sammenlignbar dose; og/eller

iii) tilstanden relatert til et glukoseregulerende peptid er valgt fra juvenil diabetes, type I-diabetes, type II-diabetes, fedme, akutt hypoglykemi, akutt hyperglykemi, nattlig hypoglykemi, kronisk hyperglykemi, glukagonomer, sekretoriske luftveislidelser, artritt, osteoporose, sentralnervesystemsykdommer, restenose, nevrodegenerativ sykdom, nyresvikt, kongestiv hjertesvikt, nefrotisk syndrom, cirrhose, lungeødem, hypertensjon, slag, irritabel tarmsyndrom, myokardialt infarkt, akutt koronarsyndrom, postkirurgiske katabolske forandringer, hibernerende myokard, diabetisk kardiomyopati, utilstrekkelig sekresjon av natrium i urin, overdreven konsentrasjon av kalium i urin, polycystisk eggstokksyndrom, respiratorisk distress, nefropati, systolisk dysfunksjon i venstre ventrikel, diaré, postoperativ dumping-syndrom, polyneuropati ved kritisk sykdom (CIPN), dyslipidemi, organvevsskade forårsaket av reperfusjon av blodstrøm som følge av iskemi, og koronar hjertesykdomsrisikofaktor- (CHDRF-)syndrom.

13. Fremgangsmåte for å fremstille et fusjonsprotein kodet av nukleinsyren ifølge et hvilket som helst av kravene 1-6, omfattende:

- (a) å tilveiebringe en vertscelle omfattende nukleinsyren ifølge krav 1 eller 2;
- (b) å dyrke vertscellen under betingelser som tillater ekspresjon av fusjonsproteinet; og
- (c) å hente ut fusjonsproteinet.

14. Fremgangsmåten ifølge krav 13, hvori

- (i) vertscellen er en prokaryotisk eller en eukaryotisk celle; og

(ii) det isolerte fusjonsproteinet hentes ut fra vertscellecytoplasmaet i en i det vesentlige oppløselig form.

- 5 **15.** Isolert vertscelle omfattende nukleinsyren ifølge et hvilket som helst av kravene 1-6 eller vektoren ifølge krav 7, hvori vertscellen er en prokaryotisk eller eukaryotisk vertscelle, hvori den prokaryotiske vertscellen eventuelt er *E. coli*.