



(12) Translation of new
European patent specification
After opposition procedure

(11) NO/EP 2734538 B2

NORWAY

(19) NO

(51) Int Cl.

C07K 14/36 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2018.10.08
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2018.05.02
(45)	Decision of the opposition in EPO	2024.07.03
	Decision of the opposition in NIPO	2024.08.19
(86)	European Application No	12747985.5
(86)	European Filing Date	2012.07.17
(87)	The European Application's Publication Date	2014.05.28
(30)	Priority	2011.07.18, US, 201161508943 P
(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	IBA Lifesciences GmbH, Rudolf-Wissell-Str. 28, 37079 Göttingen, Tyskland
(72)	Inventor	SCHMIDT, Thomas, Tabakswinkel 8, 37139 Adelebsen, Tyskland STEMBERGER, Christian, Franz-von-Defregger-Str. 17, 83607 Holzkirchen, Tyskland BUSCH, Dirk, H., Havelstr. 6a, 81677 Muenchen, Tyskland GERMEROOTH, Lothar, Am Menzelberg 16a, 37077 Goettingen, Tyskland
(74)	Agent or Attorney	KIPA AB, Box 1065, 25110 HELSINGBORG, Sverige

(54)	Title	METHOD OF REVERSIBLY STAINING A TARGET CELL
(56)	References Cited:	WO-A2-02/054065, US-A- 5 985 658, MATSUI K ET AL: "KINETICS OF T-CELL RECEPTOR BINDING TO PEPTIDE/I-EK COMPLEXES CORRELATION OF THE DISSOCIATION RATE WITH T-CELL RESPONSIVENESS", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 91, 1 December 1994 (1994-12-01), pages 12862-12866, XP002008363, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.91.26.12862 ROSAELY CASALEGNO-GARDUÃ Å+-O ET AL: "Multimer technologies for detection and adoptive transfer of antigen-specific T cells", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 59, no. 2, 22 October 2009 (2009-10-22), pages 195-202, XP019757721, ISSN: 1432-0851

SCHMIDT THOMAS G M ET AL: "The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins", NATURE PROTOCOLS, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 2, no. 6, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 1528-1535, XP001536704, ISSN: 1750-2799, DOI: 10.1038/NPROT.2007.209

RÄ Å CR GIS BOUQUIÄ Å CR ET AL: "A fast and efficient HLA multimer-based sorting procedure that induces little apoptosis to isolate clinical grade human tumor specific T lymphocytes", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 58, no. 4, 27 August 2008 (2008-08-27), pages 553-566, XP019706296, ISSN: 1432-0851

M. NAUERTH ET AL: "TCR-Ligand koff Rate Correlates with the Protective Capacity of Antigen-Specific CD8+ T Cells for Adoptive Transfer", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, vol. 5, no. 192, 3 July 2013 (2013-07-03), pages 192ra87-192ra87, XP055211659, ISSN: 1946-6234, DOI: 10.1126/scitranslmed.3005958

Tim Schroeder: "Nach Zellen angeln", Faszination Forschung, 30 June 2010 (2010-06-30), pages 28-37, XP002687294, Retrieved from the Internet:
 URL:http://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=%22fab-strep%22%20stemberger&source=web&cd=7&ved=0CD4QFjAG&url=http%3A%2F%2Fportal.mytum.de%2Fpressestelle%2Ffaszination-forschung%2F2010nr6%2F05_Zellen.pdf%2Fdownload&ei=APuIUPW3DMWw0QWa4oDgDA&usg=AFQjCNGwSHKQ R7PkfIZIEou_V9PZ6Nz-Ng&cad=rja [retrieved on 2012-11-16]

KNABEL MICHAEL ET AL: "Reversible MHC multimer staining for functional isolation of T-cell populations and effective adoptive transfer", NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 8, no. 6, 1 June 2002 (2002-06-01), pages 631-637, XP002460640, ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/NM0602-631

ODENDAHL M K ET AL: "GMP COMPLIANT ISOLATION OF UNTOUCHED CMV-SPECIFIC DONOR DERIVED CD3+CD8+T LYMPHOCYTES USING STREPTAMER-TECHNOLOGY", VOX SANGUINIS, S. KARGER AG, BASEL, CH, vol. 99, no. Suppl.1, 1 June 2010 (2010-06-01), pages 490-491, XP009164629, ISSN: 0042-9007 [retrieved on 2010-06-25]

NEUDORFER JULIA ET AL: "Reversible HLA multimers (Streptamers) for the isolation of human cytotoxic T lymphocytes functionally active against tumor- and virus-derived antigens", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 320, no. 1-2, 30 March 2007 (2007-03-30), pages 119-131, XP002518434, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/J.JIM.2007.01.001

ANITA SCHMITT ET AL: "Adoptive transfer and selective reconstitution of streptamer-selected cytomegalovirus-specific CD8+ T?cells leads to virus clearance in patients after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation", TRANSFUSION, vol. 51, no. 3, 6 December 2010 (2010-12-06), pages 591-599, XP055043927, ISSN: 0041-1132, DOI: 10.1111/j.1537-2995.2010.02940.x

anonymous: "Dissociation constant", , Retrieved from the Internet:
 URL:https://en.wikipedia.org/wiki/Dissociation_constant [retrieved on 2017-01-20]

CHRISTIAN STEMBERGER ET AL: "Novel Serial Positive Enrichment Technology Enables Clinical Multiparameter Cell Sorting", PLOS ONE, vol. 7, no. 4, 24 April 2012 (2012-04-24), page e35798, XP055043969, DOI: 10.1371/journal.pone.0035798

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/>

EP2734538

PATENTKRAV

- 5 **1.** In vitro-fremgangsmåte for reversibel farging av en målcelle, idet målcellen
omfatter et reseptormolekyl på overflaten derav, med en detekterbar etikett, der
fremgangsmåten omfatter:
- å bringe en blanding av celler som omfatter målcellen i kontakt med
- 10 (i) en reseptorbindingsreagens, reseptorbindingsreagensen omfatter minst ett
bindingssted B, hvori bindingsstedet B spesifikt binder til reseptormolekylet, hvori
dissosiasjonsratekonstanten (k_{off}) som bestemt ved overflateplasmonresonans for
bindingen mellom reseptorbindingsreagensen via bindingsstedet B og
reseptormolekylet har en verdi på $0,5 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ eller høyere, idet
15 reseptorbindingsreagensen videre omfatter minst en bindingspartner C, hvori
bindingspartneren C kan bindes reversibelt til et bindingssted Z til en
multimeriseringsreagens,
- 20 (ii) en multimeriseringsreagens, idet multimeriseringsreagensen omfatter minst to
bindingssteder Z for den reversible bindingen av bindingspartneren C til
reseptorbindingsreagensen,
- 25 hvori reseptorbindingsreagensen (i) og multimeriseringsreagensen (ii) danner
multivalente bindingskomplekser som binder til målcellen, idet hvert multivalente
bindingskompleks omfatter minst to av reseptorbindingsreagensene bundet til en av
multimeriseringsreagensen, idet det multivalente bindingskomplekset gir økt aviditet,
i forhold til reseptorbindingsreagensen; og
- 30 (iii) den detekterbare etiketten er bundet eller i stand til å binde til det multivalente
bindingskomplekset,
hvori målcellen farges ved binding av det multivalente bindingskomplekset til
målcellen, og hvori farging av målcellen er reversibel ved forstyrrelse av bindingen
mellom bindingspartneren C til reseptorbindingsreagensen og bindingsstedene Z- til
35 multimeriseringsreagensen,
hvori reseptorbindingsreagensen som spesifikt binder til reseptormolekylet er valgt
fra gruppen som består av et antistoff, et divalent antistofffragment, et monovalent
antistofffragment, et proteinbindende molekyl med antistofflignende
bindingsegenskaper og et MHC-molekyl,
- hvori målcellen er en pattedyrcelle,
fremgangsmåten omfatter videre å separere den fargede cellen fra ikke-målceller til
stede i blandingen av celler.

- 2.** Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori dissosiasjonskonstanten (K_d) for den reversible bindingen mellom bindingsstedet Z, og partneren C er i området på 10^{-2} M til 10^{-13} M.
- 5 **3.** Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori dissosiasjonsratekonstanten (k_{off}) for bindingen mellom reseptormolekylbindingsreagensen og reseptormolekylet har en verdi på $1 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ eller høyere, på $2 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ eller høyere, eller $3 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ eller høyere, på $4 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ eller høyere, på $5 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ eller høyere, på $1 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ eller høyere, på $1,5 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ eller høyere, på $2 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ eller høyere, på $3 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ eller høyere, på $4 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$, på $5 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ eller høyere, eller $1 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ eller høyere.
- 10
- 4.** Fremgangsmåten ifølge ett av kravene 1 til 3, hvori dissosiasjonskonstanten (K_d) for bindingen mellom reseptorbindingsreagensen og reseptormolekylet er i området på 10^{-2} M til 10^{-10} M.
- 15
- 5.** Fremgangsmåten ifølge krav 4, hvori dissosiasjonskonstanten (K_d) for bindingen mellom reseptorbindingsreagensen og reseptormolekylet er i området på 10^{-3} M til 10^{-10} M, eller 10^{-3} M til 10^{-9} M, eller 10^{-3} M til 10^{-8} M, eller 10^{-3} M til 10^{-7} M, eller 10^{-7} M til 10^{-10} M, eller 10^{-7} M til 10^{-9} M.
- 20
- 6.** Fremgangsmåten ifølge ett av kravene 1 til 5, som videre omfatter fjerning av fargingen fra målcellen ved å forstyrre bindingen mellom bindingspartneren C til reseptorbindingsreagensen og bindingsstedene Z til multimeriseringsreagensen.
- 25
- 7.** Fremgangsmåten ifølge krav 6, hvori fjerning av multimeriseringsreagensen resulterer i en dissosiasjon av reseptorbindingsreagensen fra den fargede cellen.
- 8.** Fremgangsmåten ifølge ett av kravene 1 til 7, hvori
- 30 (a) bindingspartneren C omfatter biotin og multimeriseringsreagensen omfatter en streptavidinanalogue eller en avidinanalogue som reversibelt binder til biotin,
- (b) bindingspartneren C omfatter en biotinanalogue som reversibelt binder til streptavidin eller avidin, og multimeriseringsreagensen omfatter streptavidin eller avidin eller en streptavidinanalogue eller en avidinanalogue som reversibelt binder til
- 35 biotinanalogen, eller
- (c) bindingspartneren C omfatter et streptavidin- eller avidinbindingspeptid og multimeriseringsreagensen omfatter streptavidin eller avidin eller en

streptavidinanalogue eller en avidinanalogue som reversibelt binder til streptavidin- eller avidinbindingspeptidet.

- 5 **9.** Fremgangsmåten ifølge krav 8, hvori bindingspartneren C omfatter streptavidinbindingspeptidet Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys og multimeriseringsreagensen omfatter streptavidinanalogen Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ eller streptavidinanalogen Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷.
- 10 **10.** Fremgangsmåten ifølge ett av kravene 1 til 9, hvori bindingen mellom bindingspartneren C og bindingsstedene Z til multimeriseringsreagensen forekommer i nærvær av et divalent kation.
- 15 **11.** Fremgangsmåten ifølge krav 10, hvori bindingspartneren C omfatter et kalmodulinbindingspeptid og multimeriseringsreagensen omfatter kalmodulin, eller
- 20 hvori bindingspartneren C omfatter et FLAG-peptid og multimeriseringsreagensen omfatter et antistoff som binder FLAG-peptidet, eller hvori den første bindingen C omfatter en oligohistidintag og multimeriseringsreagensen omfatter et antistoff som binder oligohistidintaggen.
- 25 **12.** Fremgangsmåten ifølge krav 10 til 11, hvori bindingen mellom bindingspartneren C og bindingsstedene Z til multimeriseringsreagensen avbrytes av metallionchelatering.
- 30 **13.** Fremgangsmåten ifølge krav 12, hvori metallchelateringen utføres ved tilsetning av EDTA eller EGTA.
- 14.** Fremgangsmåten ifølge ett av kravene 1 til 13, hvori multimeriseringsreagensen er en oligomer eller en polymer av streptavidin eller avidin eller av enhver analog av streptavidin eller avidin.