



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2825036 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
A01K 67/027 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2018.09.24
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2018.05.02
(86)	European Application Nr.	13713652.9
(86)	European Filing Date	2013.03.15
(87)	The European Application's Publication Date	2015.01.21
(30)	Priority	2012.03.16, US, 201261611950 P 2012.12.13, US, 201261736930 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	Regeneron Pharmaceuticals, Inc., 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591, US-USA
(72)	Inventor	MCWHIRTER, John, 2035 Crescent Drive, Tarrytown, NY 10591, US-USA MACDONALD, Lynn, 16 Gedney Way, White Plains, NY 10605, US-USA MURPHY, Andrew, J., 10 Newton Court, Croton-on-Hudson, NY 10520, US-USA
(74)	Agent or Attorney	ZACCO NORWAY AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Title	HISTIDINE ENGINEERED LIGHT CHAIN ANTIBODIES AND GENETICALLY MODIFIED RODENTS FOR GENERATING THE SAME
(56)	References Cited:	EP-A1- 2 275 443, WO-A1-92/03918, WO-A1-2011/097603, IGAWA TOMOYUKI ET AL: "Engineering the variable region of therapeutic IgG antibodies", MABS, LANDES BIOSCIENCE, US, vol. 3, no. 3, 1 May 2011 (2011-05-01), pages 243-252, XP009153597, ISSN: 1942-0870, US-A- 5 545 806, JAVIER CHAPARRO-RIGGERS ET AL: "Increasing Serum Half-life and Extending Cholesterol Lowering in Vivo by Engineering Antibody with pH-sensitive Binding to PCSK9", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 287, no. 14, 31 January 2012 (2012-01-31), pages 11090-11097, XP002684539, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M111.319764 [retrieved on 2012-01-31], IGAWA T ET AL: "Antibody recycling by engineered pH-dependent antigen binding improves the duration of antigen neutralization", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 28, no. 11, 1 November 2010 (2010-11-01), pages 1203-1207, XP009153598, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/NBT.1691, WO-A2-

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. Genetisk modifisert gnager som omfatter i sin kimlinje ved et endogent immunglobulinlettkjedelokus et immunglobulinlettkjedelokus som omfatter en enkel omorganisert human immunglobulinlettkjedevariabel regiongensekvens avledet fra
5 en omorganisert Vk1-39/J_K- eller Vk3-20/J_K-sekvens, hvori den enkle omorganiserte humane immunglobulinlettkjedevariable regiongensekvensen er operativt forbundet til en immunglobulinlettkjedekonstant regiongensekvens, og hvori
- (i) den enkle omorganiserte humane immunglobulinlettkjedevariable regiongensekvensen omfatter Vk1-39/J_K-gensekvensen som omfatter en erstatning
10 av minst ett ikke-histidinkodon med et histidinkodon konstruert for å uttrykke et histidin
- (a) ved en posisjon valgt fra 105, 106, 108, 111 og en kombinasjon derav;
- (b) ved posisjonene 105, 106, 108 og 111; eller
- 15 (c) ved posisjonene 106, 108 og 111; eller
- (ii) den enkle omorganiserte humane immunglobulinlettkjedevariable regiongensekvensen omfatter Vk3-20/J_K som omfatter en erstatning av minst ett ikke-histidinkodon med et histidinkodon konstruert for å uttrykke et histidin
- (a) ved en posisjon valgt fra 105, 106, 107, 109 og en kombinasjon
20 derav;
- (b) ved posisjonene 105, 106, 107 og 109; eller
- (c) ved posisjonene 105, 106 og 109;
- hvori posisjonene er i henhold til IMGT-nummerering.
2. Gnageren ifølge krav 1, hvori:
- 25 den immunglobulinlettkjedekonstante regiongensekvensen er en gnagerimmunglobulinlettkjedekonstant regiongensekvens, så som en endogen gnagerimmunglobulinlettkjedekonstant regiongensekvens.
3. Gnageren ifølge ett av de foregående kravene, hvori:

gnageren videre omfatter i sin kimlinje en ikke-omorganisert immunglobulintungkjedevariabel regiongensekvens som omfatter humane V_H -, D_H - og J_H -segmenter, operativt forbundet til en immunglobulintungkjedekonstant regiongensekvens, eventuelt hvori den immunglobulintungkjedekonstante regiongensekvensen er en gnagerimmunglobulintungkjedekonstant regiongensekvens, så som en endogen gnagerimmunglobulinkonstant regiongensekvens, eventuelt ved et endogent gnagerimmunglobulintungkjedelokus.

4. Gnageren ifølge ett av de foregående kravene, hvori gnageren mangler en funksjonell ikke-omorganisert immunglobulinlettkjedevariabel region.

5. Gnageren ifølge ett av de foregående kravene, hvori den enkle, omorganiserte humane immunglobulinlettkjedevariable regiongensekvensen er avledet fra en omorganisert V_K1-39/J_K5 - eller V_K3-20/J_K1 -gensekvens.

6. Gnageren ifølge ett av de foregående kravene, hvori gnageren omfatter en populasjon av antigenspesifikke antistoffer, som sammenlignet med en populasjon av antigenspesifikke antistoffer generert i gnagere ikke omfatter et substituert histidinkodon i en immunglobulinlettkjedevariabel region, er beriket for antigenspesifikke antistoffer som utviser en reduksjon i dissosiativ halveringstid ($t_{1/2}$) ved en sur pH sammenlignet med nøytral pH på minst ca. 2 ganger, minst ca. 3 ganger, minst ca. 4 ganger, minst ca. 5 ganger, minst ca. 10 ganger, minst ca. 15 ganger, minst ca. 20 ganger, minst ca. 25 ganger, minst ca. 30 ganger eller eventuelt ca. 30 ganger eller mer.

7. Gnageren ifølge ett av de foregående kravene, hvori gnageren uttrykker et antistoff som omfatter et humant immunglobulinlettkjedevariabelt domene med en substitusjon av minst én ikke-histidinrest med et histidin i en aminosyreposisjon kodet av det minst ene kodonet substituert i den immunglobulinlettkjedevariable regiongensekvensen.

8. Gnageren ifølge ett av de foregående kravene, hvori gnageren er en rotte.

9. Gnageren ifølge ett av kravene 1-7, hvori gnageren er en mus.

10. Gnageren ifølge ett av kravene 8-9, hvori den immunglobulinlettkjedekonstante regiongensekvensen er valgt fra en rotte- eller

musimmunglobulinlettkjedekontant regionensekvens, eventuelt ved henholdsvis et endogent rottelettkjedelokus eller en endogen muselettkjedelokus; og

hvor i gnageren eventuelt videre omfatter i sin kimlinje en ikke-omorganisert immunglobulintungkjedevariabel regionensekvens som omfatter humane V_H -, D_H - og J_H -segmenter operativt forbundet til en immunglobulintungkjede-kontant regionensekvens, valgt fra en rotte- eller en musetungkjede-kontant regionensekvens; eventuelt ved henholdsvis et endogent rottetungkjedetunglokus eller ved et endogent museimmunglobulintungkjedelokus.

11. Gnageren ifølge krav 10, hvor i gnageren uttrykker en populasjon av antigenspesifikke antistoffer som respons på et antigen av interesse hvor i alle antistoffer fra populasjonen omfatter:

immunglobulinlettkjedevariable domener avledet fra den samme enkle omorganiserte humane lettkjedevariable regionensekvensen som omfatter en substitusjon av minst ett ikke-histidinkodon med ett histidinkodon, og

immunglobulintungkjeder som omfatter humane tungkjedevariable domener avledet fra et repertoar av humane tungkjede- V -, D - og J -segmenter.

12. Fremgangsmåte for fremstilling av gnageren ifølge ett av de foregående kravene, hvor i fremgangsmåten omfatter å erstatte alle funksjonelle immunglobulinlettkjedevariable regionensekvenser ved et endogent immunglobulinlettkjedelokus i gnageren med den enkle omorganiserte humane immunglobulinlettkjedevariable regionensekvensen, hvor i den enkle omorganiserte humane immunglobulinlettkjedevariable regionensekvensen er operativt forbundet til en immunglobulinlettkjedekontant regionensekvens, så som en endogen gnagerlettkjedekontant regionensekvens i det endogene gnagerimmunglobulinlettkjedelokuset.

13. Fremgangsmåte for generering av et antistoff som utviser pH-avhengig binding til et antigen av interesse, som omfatter:

å immunisere en gnager ifølge ett av kravene 1 til 11, eller en gnager fremstilt av fremgangsmåten ifølge krav 12 med et antigen av interesse; og

å oppnå en B-celle som uttrykker et antistoff som binder til antigenet av interesse med en ønsket affinitet ved en nøytral pH, mens den viser redusert binding

til antigenet av interesse ved en sur pH og eventuelt (a) ved hjelp av B-cellen for å fremstille et hybridom eller (b) å isolere DNA-et som koder for antistoffet fra B-cellen eller hybridomet og plassere DNA-et i ekspresjonsvektorer og transfektere vektorene til en vertscelle.

- 5 14. Fremgangsmåten ifølge krav 13, hvori antistoffet utviser en dissosiativ halveringstid ($t_{1/2}$) ved sur pH og 37 °C på ca. 2 minutter eller mindre.

15. Fremgangsmåten ifølge krav 13 eller 14, hvori fremgangsmåten er til fremstilling av et bispesifikt antistoff som utviser pH-avhengig binding til ett eller flere antigen(er).

- 10 16. Fremgangsmåten ifølge krav 15, hvori fremgangsmåten omfatter:

(a) å identifisere en B-celle som koder for et første tungkjedevariabelt domene som binder en første epitop av interesse og uttrykker et antistoff som utviser pH-avhengig antigenbinding og å isolere en første nukleinsyre som koder for den tungkjedevariable regionen; og

- 15 (b) å identifisere en B-celle som koder for et andre tungkjedevariabelt domene som binder en andre epitop av interesse og uttrykker et antistoff som utviser pH-avhengig antigenbinding og å isolere en andre nukleinsyre som koder for den andre tungkjedevariable regionen;

- (c) å velge en tredje nukleinsyresekvens avledet fra den enkle omorganiserte humane immunglobulinlettkjedevariable regionsekvensen; og

(d) å uttrykke de første, andre og tredje nukleinsyresekvensene for å danne det bispesifikke antistoffet.

17. Gnagercelle isolert fra gnageren ifølge ett av kravene 1 til 11, eller isolert fra en gnager fremstilt ved hjelp av fremgangsmåten ifølge krav 12, hvori cellen
25 omfatter en enkel omorganisert human immunglobulinlettkjedevariabel regionensekvens som er operativt forbundet til en immunglobulinlettkjedekonstant regionensekvens og er avledet fra en omorganisert Vk1-39/Jk- eller Vk3-20/Jk-sekvens, og hvori

- (i) den enkle omorganiserte humane immunglobulinlettkjedevariable
30 regionensekvensen omfatter Vk1-39/Jk-gensekvensen som omfatter en erstatning

av minst ett ikke-histidinkodon med et histidinkodon konstruert for å uttrykke et histidin

(a) ved en posisjon valgt fra 105, 106, 108, 111 og en kombinasjon derav

5 (b) ved posisjonene 105, 106, 108 og 111; eller

(c) ved posisjonene 106, 108 og 111; eller

(ii) den enkle omorganiserte humane immunglobulinlettkjedevariable regiongensekvensen omfatter Vk3-20/Jk som omfatter en erstatning av minst ett ikke-histidinkodon med et histidinkodon konstruert for å uttrykke et histidin

10 (a) ved en posisjon valgt fra 105, 106, 107, 109 og en kombinasjon derav;

(b) ved posisjonene 105, 106, 107 og 109 eller

(c) ved posisjonene 105, 106 og 109;

hvor posisjonene er i henhold til IMGT-nummerering.

15 18. Gnagercellen ifølge krav 17, hvor cellen er en B-celle.

19. Hybridom fremstilt fra en B-celle isolert fra gnageren ifølge ett av kravene 1 til 11, eller en gnager fremstilt ved fremgangsmåten ifølge krav 12, hvor hybridomet omfatter et immunglobulinlettkjedelokus som omfatter en enkel omorganisert human immunglobulinlettkjedevariabelt regiongensekvens som er operativt bundet
20 til en immunglobulinlettkjedekonstant regiongensekvens og er avledet fra en omorganisert Vk1-39/Jk- eller Vk3-20/Jk-sekvens, og hvor

(i) den enkle omorganiserte humane immunglobulinlettkjedevariable regiongensekvensen omfatter Vk1-39/Jk-gensekvensen som omfatter en erstatning av minst ett ikke-histidinkodon med et histidinkodon konstruert for å uttrykke et
25 histidin

(a) ved en posisjon valgt fra 105, 106, 108, 111 og en kombinasjon derav

(b) ved posisjonene 105, 106, 108 og 111; eller

(c) ved posisjonene 106, 108 og 111; eller

(ii) den enkle omorganiserte humane immunglobulinlettkjedevariable regiongensekvensen omfatter $V\kappa 3-20/J\kappa$ som omfatter en erstatning av minst ett ikke-histidinkodon med et histidinkodon konstruert for å uttrykke et histidin

5 (a) ved en posisjon valgt fra 105, 106, 107, 109 og en kombinasjon derav;

(b) ved posisjonene 105, 106, 107 og 109 eller

(c) ved posisjonene 105, 106 og 109;

hvor posisjonene er i henhold til IMGT-nummerering.

20. Gnager-ES-celle som omfatter et immunglobulinlettkjedelokus som omfatter
10 ved et endogent immunglobulinlettkjedelokus en enkelt omorganisert human immunglobulinlettkjedevariabel regiongensekvens operativt forbundet til en immunglobulinlettkjedekonstant regionsekvens og avledet fra en omorganisert $V\kappa 1-39/J\kappa$ - eller $V\kappa 3-20/J\kappa$ -sekvens, og hvori

15 (i) den enkle omorganiserte humane immunglobulinlettkjedevariable regiongensekvensen omfatter $V\kappa 1-39/J\kappa$ -gensekvensen som omfatter en erstatning av minst ett ikke-histidinkodon med et histidinkodon konstruert for å uttrykke et histidin

(a) ved en posisjon valgt fra 105, 106, 108, 111 og en kombinasjon derav

20 (b) ved posisjonene 105, 106, 108 og 111; eller

(c) ved posisjonene 106, 108 og 111; eller

(ii) den enkle omorganiserte humane immunglobulinlettkjedevariable regiongensekvensen omfatter $V\kappa 3-20/J\kappa$ som omfatter en erstatning av minst ett ikke-histidinkodon med et histidinkodon konstruert for å uttrykke et histidin

25 (a) ved en posisjon valgt fra 105, 106, 107, 109 og en kombinasjon derav;

(b) ved posisjonene 105, 106, 107 og 109 eller

(c) ved posisjonene 105, 106 og 109;

hvor posisjonene er i henhold til IMGT-nummerering.