



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2825037 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	2019.09.30
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2019.05.01
(86)	European Application Nr.	13714127.1
(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 2012.03.16, US, 201261612126 P 2012.03.20, US, 201261613352 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, USA
(72)	Inventor	MCWHIRTER, John, c/o Regeneron Pharmaceuticals, Inc. 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591, USA MACDONALD, Lynn, c/o Regeneron Pharmaceuticals, Inc. 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591, USA MARTIN, Joel, H., c/o Regeneron Pharmaceuticals, Inc. 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591, USA MURPHY, Andrew, J., c/o Regeneron Pharmaceuticals, Inc. 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591, USA
(74)	Agent or Attorney	ZACCO NORWAY AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Title	RODENTS EXPRESSING PH-SENSITIVE IMMUNOGLOBULIN SEQUENCES
(56)	References Cited:	WO-A2-2011/111007 EP-A1- 2 275 443 WO-A1-2011/097603 US-A1- 2006 015 957 LEE E-CHIANG ET AL: "The application of transgenic mice for therapeutic antibody discovery", METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (CLIFTON, N.J.) UNITED STATES 2012, TOTOWA, NJ

: HUMANA PR., 1984-CLIFTON, NJ : HUMANA PR, US, vol. 901, 1 January 2012 (2012-01-01), pages 137-148, XP008162436, ISSN: 1940-6029

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

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]

MENDEZ M J ET AL: "FUNCTIONAL TRANSPLANT OF MEGABASE HUMAN IMMUNOGLOBULIN LOC1 RECAPITULATES HUMAN ANTIBODY RESPONSE IN MICE", NATURE GENETICS, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, US, vol. 15, no. 2, 1 February 1997 (1997-02-01), pages 146-156, XP002067603, ISSN: 1061-4036, DOI: 10.1038/NG0297-146

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 i sin kimbane omfatter et immunglobulinlocus som omfatter en ikke-rearrangert human sekvens av en variabel immunglobulinregion, som er operativt forbundet med en sekvens av en konstant
5 immunglobulinregion, hvor den ikke-rearrangerte humane sekvens av den variable immunglobulinregion omfatter en substitusjon av i det minste ett ikke-histidin-kodon med et histidin-kodon eller en innsetting av i det minste ett histidin-kodon i en nukleinsyresekvens som koder for en komplementaritetsbestemmende region (CDR), hvor histidin-kodonet ikke kodes av et tilsvarende humant villtype-
10 kimbane-gensegment.

2. Gnager ifølge krav 1, hvor:

(I) gnageren omfatter et første og et andre variabelt immunglobulinlocus, hvor i det minste det første eller det andre variable immunglobulinlocus
15 omfatter en ikke-rearrangert human gensekvens av den variable immunglobulinregion, som omfatter innsettingen av i det minste ett histidin-kodon eller substitusjonen av det i det minste ene ikke-histidin-kodon med det i det minste ene histidin-kodon; eller

(II) innsettingen av et histidin-kodon er i CDR valgt blant en CDR1 av en
20 tung kjede, en CDR2 av en tung kjede, en CDR3 av en tung kjede, en CDR1 av en lett kjede, en CDR2 av en lett kjede, en CDR3 av en lett kjede og en kombinasjon derav; eller

(III) den ikke-rearrangerte humane gensekvens av den variable immunglobulinregion i det variable immunglobulinlocus omfatter et
25 gruppering av 2, 3, 4 eller 5 histidiner som er substitusjoner av et histidin-kodon for et ikke-histidin-kodon og/eller innsettinger av histidin-kodoner.

3. Gnager ifølge krav 2(I), hvor både det første og det andre variable immunglobulinlocus hver omfatter en ikke-rearrangert human gensekvens av den
30 variable immunglobulinregion, som omfatter substitusjonen av det i det minste ene ikke-histidin-kodon med det i det minste ene histidin-kodon eller innsettingen av det i det minste ene histidin-kodon.

4. Gnager ifølge krav 3, hvor:

- 5 (I) det første variable immunglobulinlocus er et ikke-rearrangert humant variabelt locus av den tunge immunglobulinkjede (ikke-rearrangerte V-, D-, J-segenter); eller
- (II) det andre variable immunglobulinlocus er et ikke-rearrangert humant locus av den lette immunglobulinkjede (ikke-rearrangerte V-, J-segenter).

5. Gnager ifølge krav 4 (I), hvor:

- 10 (a) det ikke-rearrangerte humane variable locus av den tunge immunglobulinkjede omfatter ikke-rearrangerte humane V-, D- og J-segenter;
- (b) det ikke-rearrangerte locus av den tunge immunglobulinkjede omfatter ikke-rearrangerte humane V-segenter, et syntetisk D-segment som omfatter en linker, og et humant J-segment, valgfritt hvor det syntetiske D-segment omfatter i det minste ett histidin-kodon;
- 15 (c) det andre variable immunglobulinlocus omfatter en rearrangert variabel gensekvens av den lette immunglobulinkjede (rearrangert VJ-sekvens); eller
- 20 (d) det ikke-rearrangerte humane locus av den tunge immunglobulinkjede omfatter humane D-gensegenter som ikke er invertert i forhold til orienteringsretningen av immunglobulinlocuset av den tunge kjede.

6. Gnager ifølge krav 2(I), hvor i det minste ett av det første variable

25 **immunglobulinlocus eller det andre variable immunglobulinlocus er operativt forbundet med en endogen gnager-nukleinsyresekvens av den konstante region på et endogent gnager-immunglobulinlocus.**

7. Gnager ifølge krav 5(a), hvor ikke-rearrangerte humane V-, D-, J-segenter er

30 **operativt forbundet med en endogen ikke-human nukleinsyresekvens av den konstante region av den tunge immunglobulinkjede, valgfritt operativt forbundet med den endogene gnager-nukleinsyresekvens av den konstante region av den tunge immunglobulinkjede på et endogent gnager-immunglobulinlocus.**

8. Genetisk modifisert gnager, som omfatter en human ikke-rearrangert sekvens av den variable region av den tunge immunglobulinkjede, som omfatter humane V_H-, D- og J_H-segmenter, hvor den humane ikke-rearrangerte sekvens av den variable region av den tunge immunglobulinkjede er operativt forbundet med en gensekvens av den konstante region av den tunge immunglobulinkjede, hvor ett eller flere av de humane V_H-, D- og J_H-gensegmenter omfatter i det minste én substitusjon av et ikke-histidin-kodon med et histidin-kodon, og/eller i det minste én histidin-kodon-innsetting i en nukleinsyresekvens som koder for en komplementaritetsbestemmende region (CDR), hvor det substituerte eller innsatte histidin-kodon ikke kodes av et tilsvarende humant villtype-kimbanegensegment; og

en human ikke-rearrangert nukleinsyresekvens av den variable region av den lette immunglobulinkjede som omfatter humane V_L- og J-segmenter, hvor den humane ikke-rearrangerte nukleinsyresekvens av den variable region av den lette immunglobulinkjede er operativt forbundet med en gensekvens av den konstante region av den lette immunglobulinkjede, hvor ett eller flere av V_L- og J_L-gensegmentene omfatter i det minste én substitusjon av et ikke-histidin-kodon med et histidin-kodon, og/eller i det minste én histidin-kodon-innsetting i en nukleinsyresekvens som koder for en komplementaritetsbestemmende region (CDR), hvor det substituerte eller innsatte histidin-kodon av den humane ikke-rearrangerte nukleinsyresekvens av den variable region av den lette immunglobulinkjede ikke kodes av et tilsvarende humant villtype-kimbanegensegment.

25

9. Genetisk modifisert gnager ifølge krav 8, hvor:

(I) den humane ikke-rearrangerte nukleinsyresekvens av den variable region av den tunge immunglobulinkjede er operativt forbundet med en gnager-nukleinsyresekvens av den konstante region av den tunge immunglobulinkjede, valgfritt hvor gnager-nukleinsyresekvensen av den konstante region av den tunge immunglobulinkjede som er operativt forbundet med den humane ikke-rearrangerte nukleinsyresekvens av den

30

variable region av den tunge immunglobulinkjede, er på et endogent gnager-immunglobulinlocus i gnagerens kimbane; og/eller

(II) hvor gnager-nukleinsyresekvensen av den konstante region av den lette immunglobulinkjede, som er operativt forbundet med den humane ikke-rearrangerte nukleinsyresekvens av den variable region av den lette immunglobulinkjede, er på et endogent gnager-immunglobulinlocus i gnagerens kimbane.

10. Genetisk modifisert gnager ifølge krav 8 eller krav 9, hvor den ikke-rearrangerte nukleinsyresekvens av den variable region av den lette immunglobulinkjede ikke omfatter mer enn to humane V_L -gensegmenter, hvor hvert av de ikke mer enn to humane V_L -gensegmenter omfatter en substitusjon av i det minste én ikke-histidinrest med en histidinrest.

11. Genetisk modifisert gnager, som omfatter en human ikke-rearrangert sekvens av den variable region av den tunge immunglobulinkjede, som omfatter humane ikke-rearrangerte V_H -, D- og J_H -segmenter, hvor den humane ikke-rearrangerte sekvens av den variable region av den tunge immunglobulinkjede er operativt forbundet med en gensekvens av den konstante region av den tunge immunglobulinkjede, hvor ett eller flere av de humane ikke-rearrangerte V_H -, D- og J_H -gensegmenter omfatter i det minste én substitusjon av et ikke-histidin-kodon med et histidin-kodon eller i det minste én histidin-kodon-innsetting i en nukleinsyresekvens som koder for en komplementaritetsbestemmende region (CDR), hvor histidin-kodonet ikke kodes av et tilsvarende humant villtype-kimbanegensegment; og

en enkelt rearrangert human VJ-nukleinsyresekvens av den variable region av den lette immunglobulinkjede som omfatter humane V_L - og J_L -segmentsekvenser, hvor den enkelte rearrangerte humane nukleinsyresekvens av den variable region av den lette immunglobulinkjede er operativt forbundet med en gensekvens av den konstante region av den lette immunglobulinkjede, hvor den rearrangerte VJ-sekvens omfatter i det minste én substitusjon av et ikke-histidin-kodon med et histidin-kodon eller i det minste én histidin-kodon-innsetting i en nukleinsyresekvens som koder for en komplementaritetsbestemmende region

(CDR), hvor histidin-kodonet av den humane rearrangerte nukleinsyresekvens av den variable region av den lette immunglobulinkjede ikke kodes av et tilsvarende humant villtype-kimbanegensegment.

5 **12.** Genetisk modifisert gnager ifølge krav 11, hvor:

(I) den humane ikke-rearrangerte nukleinsyresekvens av den variable region av den tunge immunglobulinkjede er operativt forbundet med en gnager-nukleinsyresekvens av den konstante region av den tunge immunglobulinkjede, valgfritt hvor gnager-nukleinsyresekvensen av den konstante region av den tunge immunglobulinkjede, som er operativt forbundet med den humane ikke-rearrangerte nukleinsyresekvens av den variable region av den tunge immunglobulinkjede, er på et endogent gnager-immunglobulinlocus i gnagerens kimbane og/eller

(II) hvor gnager-sekvensen av den konstante region av den lette immunglobulinkjede, som er operativt forbundet med den humane rearrangerte nukleinsyresekvens av den variable region av den lette immunglobulinkjede, er på et endogent gnager-immunglobulinlocus i gnagerens kimbane.

20 **13.** Genetisk modifisert gnager, hvor dyret omfatter i sin kimbane i det minste én innsetting av et histidin-kodon eller i det minste én substitusjon av et ikke-histidin-kodon med et histidin-kodon i en ikke-rearrangert gensekvens av den variable region av den tunge immunglobulinkjede, som er operativt forbundet med et gen av den konstante region av den tunge kjede, på et immunglobulinlocus av den tunge kjede, hvor histidin-kodonet av immunglobulinlocuset av den tunge kjede er i en nukleinsyresekvens som koder for en komplementaritetsbestemmende region (CDR), og kodes ikke av et tilsvarende villtype-kimbanegensegment; og

i det minste én innsetting av et histidin-kodon eller i det minste én substitusjon av et ikke-histidin-kodon med et histidin-kodon i en ikke-rearrangert gensekvens av den variable region av den lette immunglobulinkjede som er operativt forbundet med et gen av den konstante region av den lette kjede på et immunglobulinlocus av den lette kjede, hvor histidin-kodonet av immunglobulinlocuset av den lette kjede er i en nukleinsyresekvens som koder for

en komplementaritetsbestemmende region (CDR), og kodes ikke av et tilsvarende villtype-kimbanegensegment.

- 14.** Fremgangsmåte for tillaging av en gnager som danner variable antistoffdomener med histidiner som kodes av manipulerede histidin-kodoner, 5 hvilken fremgangsmåte omfatter:

10 å modifisere gnageren i dens kimbane, slik at den omfatter i det minste én substitusjon av et ikke-histidin-kodon for et histidin-kodon eller i det minste én innsetting av et histidin-kodon i en ikke-rearrangert human gensekvens av den variable region av den tunge immunglobulinkjede, omfattende ikke-rearrangerte humane V_H -, D- og J_H -segmenter, hvor histidin-kodonet er i en nukleinsyresekvens som koder for en komplementaritetsbestemmende region (CDR), og kodes ikke av et tilsvarende humant villtype-kimbanegensegment; og/eller

15 å modifisere gnageren i dens kimbane, slik at den omfatter i det minste én substitusjon av et ikke-histidin-kodon for et histidin-kodon eller i det minste én innsetting av et histidin-kodon i en ikke-rearrangert human gensekvens av den variable region av den lette immunglobulinkjede, omfattende ikke-rearrangerte humane V_L - og J_L -segmenter, hvor histidin-kodonet er i en 20 nukleinsyresekvens som koder for en komplementaritetsbestemmende region (CDR), og kodes ikke av et tilsvarende humant villtype-kimbanegensegment.

- 15.** Fremgangsmåte ifølge krav 14, hvor fremgangsmåten omfatter:

25 (I) genetisk modifisering av gnagerens kimbane slik at den omfatter en human ikke-rearrangert variabel sekvens av den tunge immunglobulinkjede, som omfatter humane V_H -, D- og J_H -segmenter, og gjennomføring av histidinsubstitusjonen eller -innsettingen i de ikke-rearrangerte humane V_H -, D- og J_H -segmenter; og/eller

30 (II) genetisk å modifisere gnagerens kimbane slik at den omfatter en human ikke-rearrangert nukleinsyresekvens av den variable region av den lette immunglobulinkjede, som omfatter V_L - og J_L -segmenter, og å gjennomføre histidinsubstitusjonen eller -innsettingen i den ikke-rearrangerte humane

nukleinsyresekvens av den variable region av den lette immunglobulinkjede.

16. Fremgangsmåte for tillaging av en gnager som danner variable antistoffdomener med histidiner som kodes av manipulererte histidin-kodoner, 5 hvilken fremgangsmåte omfatter:

10 å modifisere gnageren slik at den omfatter i det minste én substitusjon av et histidin-kodon for et ikke-histidin-kodon eller i det minste én innsetting av et histidin-kodon i en ikke-rearrangert gensekvens av den variable region av den tunge immunglobulinkjede av et ikke-rearrangert immunglobulinlocus av den tunge kjede, som omfatter ikke-rearrangerte V_H-, D- og J_H-segmenter,

15 hvor histidin-kodonet er i en nukleinsyresekvens som koder for en komplementaritetsbestemmende region (CDR), og kodes ikke av et tilsvarende villtype-kimbanegensegment; og

20 å modifisere gnageren slik at den omfatter i det minste én substitusjon av et histidin-kodon for et ikke-histidin-kodon eller i det minste én innsetting av et histidin-kodon i en enkelt rearrangert variabel sekvens av den lette immunglobulinkjede, som omfatter rearrangerte V_L- og J_L-segmentsekvenser i kimbanen, hvor histidin-kodonet er i en nukleinsyresekvens som koder for en komplementaritetsbestemmende region (CDR), og kodes ikke av et tilsvarende villtype-kimbanegensegment.

17. Gnager ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 13 eller tillaget ved hjelp av 25 fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 14 til 16, hvor gnageren velges blant en mus, en rotte og en hamster.

18. Fremgangsmåte for generering av et antistoff som fremviser pH-avhengig binding til et antigen av interesse, idet fremgangsmåten omfatter immunisering av 30 en gnager ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 13 eller tillaget ved hjelp av fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 14 til 16 med et antigen av interesse, og å velge et antistoff som binder til antigenet av interesse ved en nøytral pH-verdi, idet det samtidig fremviser redusert binding til antigenet ved en

sur

pH-verdi.