



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2858487 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
A01K 67/027 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2020.02.17
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2019.10.23
(86)	European Application Nr.	13710268.7
(86)	European Filing Date	2013.03.07
(87)	The European Application's Publication Date	2015.04.15
(30)	Priority	2012.06.12, US, 201261658466 P 2012.06.22, US, 201261663131 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
	Designated Extension States:	BA ; ME
(73)	Proprietor	Regeneron Pharmaceuticals, Inc., 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591, USA
(72)	Inventor	MACDONALD, Lynn, 16 Gedney Way, White Plains, NY 10605, USA MCWHIRTHUR, John, 2152 Crescent Drive, Tarrytown, NY 10591, USA TU, Naxin, 514 Washington Avenue, Pleasantville, NY 10570, USA STEVENS, Sean, 3954 Camino Calma, San DiegoCA 92122, USA MURPHY, Andrew, J., 10 Newton Court, Croton-on-Hudson, NY 10520, USA
(74)	Agent or Attorney	ZACCO NORWAY AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Title	HUMANIZED NON-HUMAN ANIMALS WITH RESTRICTED IMMUNOGLOBULIN HEAVY CHAIN LOCI
------	-------	--

(56)	References Cited:	US-A1- 2012 167 237 WO-A2-2009/097006 US-A1- 2013 096 287 US-A1- 2012 021 409 WO-A1-2013/022782 WO-A1-2012/141798 WAGNER S D ET AL: "THE DIVERSITY OF ANTIGEN-SPECIFIC MONOCLONAL
------	-------------------	---

ANTIBODIES FROM TRANSGENIC MICE BEARING HUMAN IMMUNOGLOBULIN GENE MINILOCI", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILEY - V C H VERLAG GMBH & CO. KGAA, DE, vol. 24, 1 January 1994 (1994-01-01), pages 2672-2681, XP000944345, ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/EJL.1830241116

MAGEED R A ET AL: "Rearrangement of the human heavy chain variable region gene V3-23 in transgenic mice generates antibodies reactive with a range of antigens on the basis of VHCDR3 and residues intrinsic to the heavy chain variable region", CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB, vol. 123, no. 1, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 1-8, XP002544285, ISSN: 0009-9104, DOI: 10.1046/J.1365-2249.2001.01380.X cited in the application

KAREN FEATHERSTONE ET AL: "The Mouse Immunoglobulin Heavy Chain V-D Intergenic Sequence Contains Insulators That May Regulate Ordered V(D)J Recombination", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 285, no. 13, 26 March 2010 (2010-03-26), pages 9327-9338, XP002677428, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M109.098251 [retrieved on 2010-01-25]

CECIL HAN ET AL: "Comprehensive analysis of reproductive ADAMs: relationship of ADAM4 and ADAM6 with an ADAM complex required for fertilization in mice", BIOLOGY OF REPRODUCTION, NEW YORK, NY [U.A.] : ACADEM. PRESS, US, vol. 80, no. 5, 1 May 2009 (2009-05-01), pages 1001-1008, XP002677427, ISSN: 0006-3363, DOI: 10.1095/BIOLREPROD.108.073700 [retrieved on 2009-01-07]

NADINE TUAILLON: "Repertoire analysis in human immunoglobulin heavy chain minilocus transgenic, [mu]MT/[mu]MT mice", MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 37, no. 5, 1 April 2000 (2000-04-01), pages 221-231, XP0055049840, ISSN: 0161-5890, DOI: 10.1016/S0161-5890(00)00044-4

XU JOHN L ET AL: "Diversity in the CDR3 region of VH is sufficient for most antibody specificities", IMMUNITY, CELL PRESS, US, vol. 13, no. 1, 1 July 2000 (2000-07-01), pages 37-45, XP009147376, ISSN: 1074-7613, DOI: 10.1016/S1074-7613(00)00006-6 [retrieved on 2000-09-05] cited in the application

SUAREZ E ET AL: "Rearrangement of only one human IGHV gene is sufficient to generate a wide repertoire of antigen specific antibody responses in transgenic mice", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 43, no. 11, 1 April 2006 (2006-04-01), pages 1827-1835, XP027899401, ISSN: 0161-5890 [retrieved on 2006-04-01]

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. Mus som i sitt genom har:**

- 5 (a) en ikke-rearrangert human genomisk sekvens som omfatter et enkelt humant V_H -gensegment, ett eller flere humane D_H -gensegmenter og ett eller flere humane J_H -gensegmenter, hvor det enkelte humane V_H -gensegment, ett eller flere humane D_H -gensegmenter og ett eller flere humane J_H -gensegmenter er operativt forbundet med et gen fra en konstant mus-immunglobulintungkjederegion, og hvor det enkelte humane V_H -gensegment er V_{H1-2} , V_{H1-69} , V_{H2-26} , V_{H2-70} eller en polymorf variant derav; og
- 10 (b) en sekvens som koder et mus-ADAM6a-protein eller et funksjonelt fragment derav, og en sekvens som koder et mus-ADAM6b-protein eller et funksjonelt fragment derav, hvor mus-ADAM6a-proteinet eller funksjonelt fragment derav og mus-ADAM6b-proteinet eller funksjonelt fragment derav, er funksjonelle hos en hannmus, hvor nevnte kodende sekvenser befinner seg på en annen posisjon enn et ADAM6-locus av en villtype-mus
- 15 slik at, som reaksjon på eksponering for et antigen, uttrykker B-celler av musen humane variable tungkjededomener som uttrykkes fra et humant variabelt tungkjededomene som innbefatter et V_H -gensegment som er identisk med eller er en somatisk hypermutert versjon av V_{H1-2} , V_{H1-69} , V_{H2-26} , V_{H2-70} , eller en
- 20 polymorf variant derav; hvor nevnte mus mangler et funksjonelt endogent ADAM6-gen.

2. Mus ifølge krav 1, hvor:

- 25 (I) det enkelte humane V_H -gensegment er en polymorf variant av V_{H1-2} , V_{H1-69} , V_{H2-26} eller V_{H2-70} ;
- (II) de kodende sekvenser er til stede på en posisjon i musegenomet annet enn på et endogent immunglobulintungkjede-locus;
- (III) de kodende sekvenser er plassert ved siden av eller tilgrensende den ikke-rearrangerte humane genomiske sekvens;
- 30 (IV) den ikke-rearrangerte humane genomisk sekvens er til stede på et endogent immunglobulintungkjede-locus;

- (V) den ikke-rearrangerte humane genomiske sekvens er til stede på et endogent immunglobulintungkjede-locus, og de kodende sekvenser er til stede på en posisjon i musegenomet annet enn på et endogent immunglobulintungkjede-locus;
- 5 (VI) musen omfatter en delesjon av alle eller av i det vesentlige alle endogene V_H -gensegmenter; eller
- (VII) genet fra en konstant mus-immunglobulintungkjederegion er på et endogent immunglobulintungkjede-locus.
- 10 **3. Mus ifølge krav 1, hvor:**
- (I) det enkelte humane V_H -gensegment er V_{H1-69} ; eller
- (II) det enkelte humane V_H -gensegment er V_{H1-2} .
- 4. Mus ifølge krav 1, hvor:**
- 15 (I) den ikke-rearrangerte humane genomisk sekvens omfatter det humane V_{H1-69} -gensegment, tjuesju humane D_H -gensegmenter og seks humane J_H -gensegmenter; eller
- (II) den ikke-rearrangerte humane genomisk sekvens omfatter det humane V_{H1-2} -gensegment, tjuesju humane D_H -gensegmenter og seks humane J_H -
- 20 gensegmenter.
- 5. Mus ifølge krav 1 eller 4, som videre omfatter i sitt genom ett eller flere humane V_K -gensegmenter og ett eller flere humane J_K -gensegmenter, valgfritt hvor det ene eller de flere humane V_K -gensegmenter og ett eller flere humane J_K -gensegmenter**
- 25 **er til stede på et endogent lettkjede-immunglobulin-locus.**
- 6. Mus som omfatter i sitt genom en nukleinsyresekvens som omfatter et enkelt humant V_H -gensegment, i det minste ett humant D_H -gensegment og i det minste ett humant J_H -gensegment, hvor det enkelte humane V_H -gensegment, det ene eller de**
- 30 **flere humane D_H -gensegmenter og det ene eller de flere humane J_H -gensegmenter er operativt forbundet med et gen fra en konstant mus-immunglobulintungkjederegion, hvor det enkelte humane V_H -gensegment er V_{H1-2} , V_{H1-69} , V_{H2-26} , V_{H2-70} eller en polymorf variant derav, hvor musen mangler et**

funksjonelt endogent ADAM6-gen, og hvor musen omfatter ektopiske sekvenser fra mus-ADAM6 som koder et ADAM6a-protein eller et funksjonelt fragment derav, og et ADAM6b-protein eller et funksjonelt fragment derav.

5 **7. Mus ifølge krav 6, hvor:**

- (I) de ektopiske sekvenser fra mus-ADAM6 er til stede på et endogent immunglobulin-locus; eller
- (II) de ektopiske sekvenser fra mus-ADAM6 er til stede i musegenomet på en posisjon annet enn på et endogent immunglobulin-locus.

10

8. Celle eller vev avledet fra musen ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor cellen eller vevet omfatter

- (a) en ikke-rearrangert human genomisk sekvens som omfatter et enkelt humant V_H -gensegment, ett eller flere humane D_H -gensegmenter og ett eller flere humane J_H -gensegmenter, hvor det enkelte humane V_H -gensegment, ett eller flere humane D_H -gensegmenter og ett eller flere humane J_H -gensegmenter er operativt forbundet med et gen fra en konstant mus-immunglobulintungkjederegion, hvor det enkelte humane V_H -gensegment er V_{H1-2} , V_{H1-69} , V_{H2-26} , V_{H2-70} eller en polymorf variant derav; og
- (b) en sekvens som koder et ADAM6a-protein eller et funksjonelt fragment derav, og en sekvens som koder et ADAM6b-protein eller et funksjonelt fragment derav, hvor mus-ADAM6a-proteinet eller funksjonelt fragment derav og mus-ADAM6b-proteinet eller funksjonelt fragment derav, er funksjonelle hos en hannmus, hvor nevnte kodende sekvenser befinner seg på en annen posisjon enn et ADAM6-locus av en villtype-mus.

25

9. Fremgangsmåte for fremstilling av et humant antistoff som omfatter en immunglobulintungkjede avledet fra et enkelt humant V_H -gensegment, idet fremgangsmåten omfatter

- (a) å immunisere musen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7 med et antigen av interesse;
- (b) å tillate nevnte mus å aktivere en immunrespons i forhold til antigenet av interesse; og

30

(c) å identifisere eller isolere en sekvens av en variabel region av en immunglobulintungkjede som koder et variabelt domene av en immunglobulintungkjede av et av musen generert antistoff, hvor antistoffet binder antigenet av interesse.

5

10. Fremgangsmåte ifølge krav 9, hvor:

(I) det variable domene av en immunglobulintungkjede er i det minste 75%, i det minste 80%, i det minste 85%, i det minste 90%, i det minste 95% eller i det minste 98% identisk med SEQ ID NO: 5;

10 (II) det variable domene av en immunglobulintungkjede omfatter SEQ ID NO: 5;

(III) det variable domene av en immunglobulintungkjede er i det minste 75%, i det minste 80%, i det minste 85%, i det minste 90%, i det minste 95% eller i det minste 98% identisk med SEQ ID NO: 64; eller

15 (IV) det variable domene av en immunglobulintungkjede omfatter SEQ ID NO: 64.

11. Fremgangsmåte for modifisering av et domene av et immunglobulintungkjede-locus av en mus for å tilveiebringe en mus hvis genom omfatter et
20 immunglobulintungkjede-locus som innbefatter et enkelt humant V_H-segment, idet fremgangsmåten omfatter:

(a) å gjennomføre en første modifikasjon av et immunglobulintungkjede-locus av en mus, som innbefatter inserasjonen av et enkelt humant V_H-segment og resulterer i en reduksjon eller eliminasjon av endogen mus-ADAM6-aktivitet hos en hannmus, hvor det enkelte humane V_H-gensegment
25 er V_H1-2, V_H1-69, V_H2-26, V_H2-70 eller en polymorf variant derav; og

(b) å gjennomføre en andre modifikasjon av musen for å gjenopprette ADAM6-aktivitet til musen, som omfatter ekspresjon av sekvenser som koder et mus-ADAM6a-protein eller et funksjonelt fragment derav og et mus-
30 ADAM6b-protein eller et funksjonelt fragment derav, hvor mus-ADAM6a-proteinet eller funksjonelt fragment derav og mus-ADAM6b-proteinet eller funksjonelt fragment derav, er funksjonelle i en hannmus.

12. Fremgangsmåte for å generere et antistoff som er spesifikt mot et antigen, idet fremgangsmåten omfatter trinnene av:

- (a) å immunisere musen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7 med antigenet;
- 5 (b) å isolere i det minste én celle fra musen som produserer et antistoff som er spesifikt mot antigenet; og
- (c) å dyrke i det minste én celle som produserer et antistoff ifølge trinn (b) og å oppnå nevnte antistoff.

10 **13.** Fremgangsmåte ifølge krav 12, hvor:

- (I) dyrking i trinn (c) utføres på i det minste én hybridomcelle som genereres fra den i det minste ene celle oppnådd i trinn (b);
- (II) den i det minste ene celle oppnådd i trinn (b) er avledet fra milten, en lymfeknute eller benmarg fra musen i trinn (a); eller
- 15 (III) immunisering med antigenet i trinn (a) utføres med protein, DNA, en kombinasjon av DNA og protein, eller celler som uttrykker antigenet.

14. Anvendelse av musen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, for å oppnå en nukleinsyresekvens som koder et humant variabelt domene av en
20 immunglobulintungkjede.