



(12) Translation of  
European patent specification

(11) NO/EP 3262168 B1

NORWAY

(19) NO  
(51) Int Cl.  
**C12N 15/09 (2006.01)**

**Norwegian Industrial Property Office**

---

|      |                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|------|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (21) | Translation Published                                                      | 2019.12.16                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| (80) | Date of The European<br>Patent Office Publication of<br>the Granted Patent | 2019.08.21                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| (86) | European Application Nr.                                                   | 16710378.7                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| (86) | European Filing Date                                                       | 2016.02.26                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| (87) | The European Application's<br>Publication Date                             | 2018.01.03                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| (30) | Priority                                                                   | 2015.02.27, US, 201562126213 P<br>2016.02.23, US, 201662298869 P                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| (84) | Designated Contracting<br>States:                                          | AL ; AT ; BE ; BG ; CH ; CY ; CZ ; DE ; DK ; EE ; ES ; FI ; FR ; GB ; GR ; HR ; HU ;<br>IE ; IS ; IT ; LI ; LT ; LU ; LV ; MC ; MK ; MT ; NL ; NO ; PL ; PT ; RO ; RS ; SE ; SI ;<br>SK ; SM ; TR                                                                                                                                                       |
|      | Designated Extension<br>States:                                            | BA ; ME                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|      | Designated Validation<br>States:                                           | MA ; MD                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| (73) | Proprietor                                                                 | Regeneron Pharmaceuticals, Inc., 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY<br>10591, USA                                                                                                                                                                                                                                                               |
| (72) | Inventor                                                                   | BURAKOV, Darya, c/o Regeneron Pharmaceuticals, Inc.777 Old Saw Mill River<br>Road, Tarrytown, New York 10591, USA<br>GOREN, Michael, c/o Regeneron Pharmaceuticals, Inc.777 Old Saw Mill River<br>Road, Tarrytown, New York 10591, USA<br>CHEN, Gang, c/o Regeneron Pharmaceuticals, Inc.777 Old Saw Mill River Road,<br>Tarrytown, New York 10591, USA |
| (74) | Agent or Attorney                                                          | OSLO PATENTKONTOR AS, Hoffsvæien 1A, 0275 OSLO, Norge                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

---

|      |                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|------|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (54) | Title                | <b>HOST CELL PROTEIN MODIFICATION</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| (56) | References<br>Cited: | KIM DAESOO ET AL: "Phospholipase C isozymes selectively couple to specific neurotransmitter<br>receptors", NATURE (LONDON), vol. 389, no. 6648, 1997, pages 290-293, XP002757066,<br>ISSN: 0028-0836<br>BRUNTZ RONALD C ET AL: "Phospholipase D Signaling Pathways and Phosphatidic Acid as<br>Therapeutic Targets in Cancer", PHARMACOLOGICAL REVIEWS, vol. 66, no. 4, October 2014<br>(2014-10), pages 1033-1079, XP002757069,<br>BOGARAPU SOUJANYA ET AL: "Phenotype of a Patient With Contiguous Deletion of TBX5 and<br>TBX3: Expanding the Disease Spectrum", AMERICAN JOURNAL OF MEDICAL GENETICS, |

vol. 164, no. 5, May 2014 (2014-05), pages 1304-1309, XP002757068,  
KURIAN MANJU A ET AL: "Phospholipase C beta 1 deficiency is associated with early-onset  
epileptic encephalopathy", BRAIN, vol. 133, no. Part 10, October 2010 (2010-10), pages 2964-  
2970, XP002757067,

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. Rekombinant vertscelle som omfatter en modifikasjon i en kodende sekvens av et polynukleotid som koder for et fosfolipase-B-lignende-2- (PLBD2-) protein, hvor modifikasjonen reduserer ekspresjonsnivået til PLBD2-proteinet i forhold til  
5 ekspresjonsnivået til et PLBD2-protein i en celle som mangler modifikasjonen, hvor cellen ikke uttrykker detekterbart PLBD2-protein og hvor cellen videre omfatter et eksogent tilført gen som koder for et protein av interesse.
2. Vertscelle ifølge krav 1, hvor:
  - 10 (a) alle alleler i kodingssekvensen til polynukleotidet som koder for fosfolipase-B-lignende-2- (PLBD2-) protein omfatter modifikasjonen; og/eller
  - (b) modifikasjonen omfatter en nukleotidinnsetting eller -delesjon i ekson 1 av den kodende sekvensen til polynukleotidet som koder for PLBD2-proteinet.
- 15 3. Vertscelle ifølge krav 1 eller 2, hvor PLBD2-proteinet omfatter en aminosyresekvens som er minst 80% identisk med SEQ ID NO: 32.
4. Vertscelle ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, hvor PLBD2-proteinet omfatter en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID  
20 NR: 32, SEQ ID NR: 34, SEQ ID NR: 35 og SEQ ID NR: 36.
5. Vertscelle ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4, hvor modifikasjonen omfatter en nukleotidinnsetting eller delesjon i SEQ ID NO: 47.
- 25 6. Vertscelle ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5, hvor det eksogene proteinet av interesse er valgt fra gruppen bestående av en antistoff-tungkjede, en antistoff-lettkjede, et antigenbindende fragment og et Fc-fusjonsprotein.
7. Vertscelle ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 6, hvor cellen  
30 produserer en Protein-A-bindende fraksjon som ikke har noen påvisbar esteraseaktivitet.
8. Rekombinant vertscelle ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, hvor:
  - (a) PLBD2 genmodifikasjonen omfatter en biallel modifikasjon; og/eller
  - 35 (b) PLBD2- genmodifikasjonen omfatter en delesjon av 1 eller flere basepar, 2 eller flere basepar, 3 eller flere basepar, 4 eller flere basepar, 5 eller flere basepar, 6 eller flere basepar, 7 eller flere basepar, 8 eller flere

basepar, 9 eller flere basepar, 10 eller flere basepar, 11 eller flere  
basepar, 12 eller flere basepar, 13 eller flere basepar, 14 eller flere  
basepar, 15 eller flere basepar, 16 eller flere basepar, 17 eller flere  
basepar, 18 eller flere basepar, 19 eller flere basepar, eller 20 eller flere  
basepar av PLBD2-genet: og / eller

(c) PLBD2- genmodifikasjonen resulterer i et rammeskifte av det translaterte  
PLBD2-proteinet.

9. Rekombinant vertscelle ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 8, hvor  
modifikasjonen er en målrettet forstyrrelse på et målsted, hvor målstedet er valgt  
fra gruppen bestående av nukleotidene som strekker seg over posisjonene  
nummerert 37-56, 44-56, 33-62, 40-69, 110-139, 198-227, 182-211 og 242-271  
av SEKV. ID NR: 33.

10. Rekombinant vertscelle ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9, hvor  
den rekombinante vertscellen er en eukaryotisk celle; eventuelt  
hvor den eukaryote cellen er en pattedyrscelle; eventuelt  
hvor den eukaryote cellen er valgt fra gruppen bestående av CHO K1-celle,  
en DXB-11 CHO-celle, en Veggie-CHO-celle, en COS-7-celle, en Vero-celle, en CV1-  
celle, en HEK293-celle, en 293 EBNA-celle, en MSR 293-celle, en MDCK-celle, en  
HaK-celle, en BHK21-celle, en Hela-celle, en HepG2-celle, en WI38-celle, en MRC 5-  
celle, en Colo25-celle, en HB 8065-celle, en HL-60-celle, en Jurkat-celle, en Daudi-  
celle, en A431-celle, en U937-celle, en 3T3-celle, en L-celle, en C127-celle, en  
SP2/O-celle, en NS-O-celle og en MMT-celle; eventuelt  
hvor cellen er en CHO-celle.

11. Fremgangsmåte for å redusere esteraseaktivitet i en proteinformulering  
omfattende trinnene: (a) å modifisere en vertscelle for å redusere eller fjerne  
ekspresjonen av fosfolipase-B-lignende-2- (PLBD2-) protein, (b) å transfektere  
vertscellen med et polynukleotid som koder et protein av interesse, (c) ekstraksjon  
av en proteinfraksjon omfattende proteinet av interesse fra vertscellen, (d) å  
kontakte proteinfraksjonen med en kromatografikolonne valgt fra gruppen  
bestående av Protein A-affinitet (PA), kationbytte (CEX), og anionbytte (AEX), (e) å  
samle opp proteinet av interesse fra media, og (f) å kombinere proteinet av  
interesse med en fettsyreester, og eventuelt en buffer og termisk stabilisator.

12. Fremgangsmåte ifølge krav 11, hvor trinnet av å modifisere en vertscelle for  
å redusere eller fjerne ekspresjonen av fosfolipase-B-lignende-2- (PLBD2-) protein

inkluderer å sette inn eller slette minst ett nukleotid i ekson 1 av et polynukleotid som koder for PLBD2-proteinet.

13. Fremgangsmåte ifølge krav 12, hvor polynukleotidet som koder for PLBD2-  
5 proteinet omfatter en nukleinsyresekvens som er minst 80% identisk med SEQ ID  
NR: 32.