



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3294760 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 14/195 (2006.01)
A61K 35/00 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61P 3/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 9/06 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2021.08.30
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2021.03.24
(86)	European Application Nr.	16728448.8
(86)	European Filing Date	2016.05.13
(87)	The European Application's Publication Date	2018.03.21
(30)	Priority	2015.05.13, US, 201562161137 P 2015.11.16, US, 201562256052 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	Synlogic Operating Company, Inc., 251 Little Falls Drive Wilmington, County of New Castle, DE 19808, USA
(72)	Inventor	FALB, Dean, 180 Lake Street, Sherborn, MA 01770, USA ISABELLA, Vincent, M., 465 Putnam AvenueUnit 1, Cambrige, MA 02139, USA KOTULA, Jonathan, W., 345 Washington Street, Somerville, MA 02143, USA MILLER, Paul, F., 39 Emerald Glen Lane, Salem, CT 06420, USA ROWE, Sarah, 9 Kingman Road, Somerville, MA 02143, USA MILLET, Yves, 15 Frederick Street, Newton, MA 02460, USA
(74)	Agent or Attorney	ZACCO NORWAY AS, Postboks 488, 0213 OSLO, Norge

(54) Title **BACTERIA ENGINEERED TO REDUCE HYPERPHENYLALANINEMIA**

(56) References

Cited:

WO-A1-2014/066945

WO-A2-2016/210373

WO-A1-2014/018832

WO-A2-2013/192543

CHEN X ET AL: "High-level Expression of Phenylalanine Ammonia-lyase in Lactococcus lactis via Synthesized Sequence Based on Bias Codons", CHINESE JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY,, vol. 22, no. 2, 1 March 2006 (2006-03-01), pages 187-190, XP022857531, ISSN: 1872-2075, DOI: 10.1016/S1872-2075(06)60022-8 [retrieved on 2006-03-01]

LIU JINGZHONG ET AL: "Study on a novel strategy to treatment of phenylketonuria", ARTIFICIAL CELLS, BLOOD SUBSTITUTES, AND IMMOBILIZATION BIOTECHNOLOGY, MARCEL DEKKER INC, US, vol. 30, no. 4, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 243-257, XP009172887, ISSN: 1073-1199

J. CHRISTODOULOU ET AL: "Abstr. 166. Enzyme substitution therapy for phenylketonuria delivered orally using a genetically modified probiotic: proof of principle.", 62ND ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HUMAN GENETICS, 6-10 NOVEMBER 2012, SAN FRANCISCO, vol. 62, 8 November 2012 (2012-11-08), - 10 November 2012 (2012-11-10), pages 1-1, XP055264422, US

KANG T S ET AL: "Converting an injectable protein therapeutic into an oral form: Phenylalanine ammonia lyase for phenylketonuria", MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM, ACADEMIC PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 99, no. 1, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 4-9, XP026802464, ISSN: 1096-7192 [retrieved on 2009-09-11]

SARKISSIAN CHRISTINEH N ET AL: "A different approach to treatment of phenylketonuria: Phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US , vol. 96, no. 5 2 March 1999 (1999-03-02), pages 2339-2344, XP002525651, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.96.5.2339 Retrieved from the Internet:

URL:<http://www.pnas.org/content/96/5/2339.full> [retrieved on 2016-08-09]

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/>

[EP3294760]

1

Patentkrav**1.** Genetisk konstruert bakterie omfattende:

a) ett eller flere gener som koder for en fenylalaninammoniakklyase (PAL), hvori genet/genene som koder for en PAL, er operativt bundet til en induserbar promotor som ikke er assosiert med PAL-genet i naturen, hvori ekspresjon av genet/genene som koder for PAL, øker i nærvær av en induser til promotoren; og

b) ett eller flere gener som koder for en fenylalanintransportør som er i stand til å transportere fenylalanin inn i bakterieceller, hvori genet/genene som koder for fenylalanintransportøren, er operativt bundet til en induserbar promotor som ikke er assosiert med fenylalanintransportørgenet i naturen, hvori ekspresjon av genet/genene som koder for fenylalanintransportøren øker i nærvær av en induser til promotoren.

2. Den genetisk konstruerte bakterien ifølge krav 1, ytterligere omfattende ett eller flere gener som koder for en L-aminosyredeaminase (LAAD), hvori genet/genene som koder for LAAD, er operativt bundet til en induserbar promotor som ikke er assosiert med LAAD-genet i naturen, hvori ekspresjon av genet/genene som koder for LAAD, øker i nærvær av en induser til promotoren.

3. Den genetisk konstruerte bakterien ifølge krav 1 eller krav 2, hvori promotoren som er operativt bundet til genet/genene som koder for en PAL, og promotoren som er operativt bundet til genet/genene som koder for en fenylalanintransportør, er separate kopier av den samme promotoren.

4. Den genetisk konstruerte bakterien ifølge krav 1 eller krav 2, hvori genet/genene som koder for en PAL, og genet/genene som koder for en fenylalanintransportør, er operativt bundet til den samme kopien av den samme promotoren.

5. Den genetisk konstruerte bakterien ifølge et hvilket som helst av kravene 2-4, hvori genet/genene som koder for en LAAD, er operativt bundet til en promotor

[EP3294760]

som er forskjellig fra promotoren til genet/genene som koder for en PAL, og genet/genene som koder for en fenylalanintransportør.

5 **6.** Den genetisk konstruerte bakterien ifølge et hvilket som helst av kravene 1-5, hvori promotoren eller promotorene som er operativt bundet til genet/genene som koder for en PAL, og genet/genene som koder for en fenylalanintransportør, induseres under lavoksygen- eller anaerobe betingelser.

10 **7.** Den genetisk konstruerte bakterien ifølge et hvilket som helst av kravene 1-6, hvori promotoren eller promotorene som er operativt bundet til genet/genene som koder for en PAL, og genet/genene som koder for en fenylalanintransportør, er valgt fra gruppen bestående av:

- 15 (a) en promotor til hvilken en fumarat- og nitratreduktaseregulator (FNR) er i stand til å binde, hvori bindingen av FNR aktiverer nedstrøms genekspresjon,
- (b) en promotor til hvilken en arginindeiminase- og nitratreduksjonsregulator (ANR) er i stand til å binde, hvori bindingen av ANR aktiverer nedstrøms genekspresjon, og
- (c) en promotor til hvilken en dissimilatorisk nitratrespirasjonsregulator (DNR) er i stand til å binde, hvori bindingen av DNR aktiverer nedstrøms genekspresjon.

20 **8.** Den genetisk konstruerte bakterien ifølge krav 7, hvori promotoren eller promotorene som er operativt bundet til genet/genene som koder for en PAL, og genet/genene som koder for en fenylalanintransportør, er valgt fra gruppen bestående av:

- 25 (a) en promotor valgt fra *fnrS*, *nirB*, *ydjZ*, *pdhR*, *focA*, *ndH*, *hlyE*, *narK*, *narX*, *narG*, *yfiD*, *tdcD*, *arcDABC*, *norB* og *norC*;
- (b) en promotor omfattende et hvilket som helst av SEQ ID No 9 til 19 eller et fragment av et hvilken som helst derav; eller
- 30 (c) en promotor omfattende en nukleinsyresekvens som er minst 80 % homolog med et hvilket som helst av SEQ ID No 9 til 20.

9. Den genetisk konstruerte bakterien ifølge et hvilket som helst av kravene 5-8, hvori genet/genene som koder for en PAL, og genet/genene som koder for en

[EP3294760]

fenylalanintransportør, er operativt bundet til den samme kopien av den samme promotoren.

5 **10.** Den genetisk konstruerte bakterien ifølge et hvilket som helst av kravene 1-9, hvori genet/genene som koder for en fenylalanintransportør, er lokalisert på et kromosom i bakterien eller på et plasmid i bakterien.

10 **11.** Den genetisk konstruerte bakterien ifølge et hvilket som helst av kravene 1-10, hvori genet/genene som koder for en PAL, er lokalisert på et plasmid i bakterien eller på et kromosom i bakterien.

15 **12.** Den genetisk konstruerte bakterien ifølge et hvilket som helst av kravene 1-11, hvori PAL-en er fra *Anabaena variabilis* (PAL1) eller fra *Photorhabdus luminescens* (PAL3).

13. Den genetisk konstruerte bakterien ifølge et hvilket som helst av kravene 1-12, hvori fenylalanintransportøren er PheP.

20 **14.** Den genetisk konstruerte bakterien ifølge et hvilket som helst av kravene 1-13, hvori den konstruerte bakterien omfatter 1-5 kopier av et gene/gener som koder for en PAL, 1-5 kopier av et gen/gener som koder for en fenylalanintransportør, og eventuelt 1-5 kopier av et gen/gener som koder for en LAAD.

25 **15.** Den genetisk konstruerte bakterien ifølge et hvilket som helst av kravene 1-14, hvori bakterien er en probiotisk bakterie, eventuelt hvori bakterien er valgt fra gruppen bestående av *Bacteroides*, *Bifidobakterie*, *Clostridium*, *Escherichi*, *Lactobacillus* og *Lactococcus*.

30 **16.** Den genetisk konstruerte bakterien ifølge krav 15, hvori bakterien er *Escherichia coli*-stamme *Nissle*.

[EP3294760]

4

17. Den genetisk konstruerte bakterien ifølge et hvilket som helst av kravene 1-16, hvori bakterien er en auxotrof i diaminopimelinsyre eller en auxotrof i tymin.

5 **18.** Den genetisk konstruerte bakterien ifølge et hvilket som helst av kravene 1-17, hvori bakterien er ytterligere konstruert til å romme et gen som koder for et stoff toksisk for bakterien, hvori genet styres av en promotor som induseres av en miljøbetingelse eller -faktor.

10 **19.** Farmasøytisk akseptabel sammensetning omfattende bakterien ifølge et hvilket som helst av kravene 1-18; og en farmasøytisk akseptabel bærer.

20. Sammensetningen ifølge krav 19 formulert for oral administrering.

15 **21.** Den genetisk konstruerte bakterien ifølge et hvilket som helst av kravene 1-18 eller sammensetningen ifølge krav 19 eller krav 20 for anvendelse i en fremgangsmåte for å redusere hyperfenylalaninemi eller behandle en sykdom assosiert med hyperfenylalaninemi.

20 **22.** Den genetisk konstruerte bakterien for anvendelse ifølge krav 21 eller sammensetningen for anvendelse ifølge krav 21, hvori sykdommen er valgt fra gruppen bestående av: fenylketonuri, klassisk eller typisk fenylketonuri, atypisk fenylketonuri, permanent mild hyperfenylalaninemi, non-fenylketonurisk hyperfenylalaninemi, fenylalaninhydroksylasemangel, kofaktormangel, dihydropteridinreduktasemangel, tetrahydropterinsyntasemangel, Segawas
25 sykdom og leversykdom.