



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3630967 B1

NORWAY

(19) NO

(51) Int Cl.

C12N 9/24 (2006.01)

C12N 9/52 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2024.08.19
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2024.06.12
(86)	European Application Nr.	18728576.2
(86)	European Filing Date	2018.05.25
(87)	The European Application's Publication Date	2020.04.08
(30)	Priority	2017.05.26, GB, 201708471 2017.05.26, GB, 201708476 2018.04.24, GB, 201806655
(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	Genovis AB, Box 4, 244 21 Kaevlinge, Sverige
(72)	Inventor	LEO, Fredrik, 244 21 Kaevlinge, Sverige LOOD-ALAYÓN, Rolf, 244 21 Kaevlinge, Sverige BJORK, Stephan, 244 21 Kaevlinge, Sverige MEJARE, Malin, 244 21 Kaevlinge, Sverige OLSSON, Fredrik, 244 21 Kaevlinge, Sverige
(74)	Agent or Attorney	RWS, Europa House, Chiltern Park, Chiltern Hill, SL99FG CHALFONT ST PETER, Storbritannia

(54) Title **PROTEASE AND BINDING POLYPEPTIDE FOR O-GLYCOPROTEINS**

(56) References

Cited:

DATABASE UniProt [online] 1 July 2008 (2008-07-01), "SubName: Full=Uncharacterized protein {ECO:0000313|EMBL:ACD04945.1}";, XP055755394, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:B2UR60 Database accession no. B2UR60
DATABASE EMBL [online] 6 May 2008 (2008-05-06), "Akkermansia muciniphila ATCC BAA-835 hypothetical protein", XP002782763, retrieved from EBI accession no. ACD04945 Database accession no. ACD04945
GILLES VAZEUX ET AL: "Identification of Glutamate Residues Essential for Catalytic Activity and Zinc Coordination in Aminopeptidase A", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 15, 12 April 1996 (1996-04-12), US, pages 9069 - 9074, XP055489638, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.271.15.9069
"Encyclopedia of Analytical Chemistry", 15 September 2006, JOHN WILEY & SONS, LTD, Chichester, UK, ISBN: 978-0-47-002731-8, article HENRI DEBRAY ET AL: "Glycoprotein Analysis: General Methods", XP055074808, DOI: 10.1002/9780470027318.a0307
RAWLINGS N D ET AL: "EVOLUTIONARY FAMILIES OF METALLOPEPTIDASES", METHODS IN ENZYMOLOGY, ACADEMIC PRESS, US, vol. 248, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 183 - 228, XP001122228, ISSN: 0076-6879, DOI: 10.1016/0076-6879(95)48015-3

HUANG KUN ET AL: "Biochemical characterisation of the neuraminidase pool of the human gut symbiont *Akkermansia muciniphila*", CARBOHYDRATE RESEARCH, PERGAMON, GB, vol. 415, 14 August 2015 (2015-08-14), pages 60 - 65, XP029296667, ISSN: 0008-6215, DOI: 10.1016/J.CARRES.2015.08.001

LEE RA MI ET AL: "rbCLCA1 is a putative metalloprotease family member: localization and catalytic domain identification", AMINO ACIDS, SPRINGER VERLAG, AU, vol. 48, no. 3, 28 October 2015 (2015-10-28), pages 707 - 720, XP035889346, ISSN: 0939-4451, [retrieved on 20151028], DOI: 10.1007/S00726-015-2119-6

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. Sammensetning omfattende et polypeptid som har endoproteaseaktivitet spesifikk for O-glykosylerte proteiner som omfatter:
 - 5 (a) en aminosyresekvens til SEQ ID NO: 1;
 - (b) en aminosyresekvens som er minst 85 % identisk med aminosyresekvensen til SEQ ID NO: 1; eller
 - (c) en aminosyresekvens som er et fragment av sekvensen til SEQ ID NO: 1 eller et fragment av en aminosyresekvens som er 85 % identisk med aminosyresekvensen til SEQ
10 ID NO: 1,hvor sammensetningen videre omfatter en sialidase Am1757 eller en blanding av Am1757 og Am0707, hvor Am1757 er et polypeptid av et hvilket som helst av SEQ ID NO: 9 til 11 og Am0707 er et polypeptid av et hvilket som helst av SEQ ID NO: 12 til 14.
- 15 2. Sammensetningen ifølge krav 1, hvor polypeptidet har en aminosyresekvens som er minst 85 % identisk med aminosyresekvensen til SEQ ID NO: 1, eller fragmentet derav, omfatter mønsteret HEbbH, hvor b er en uladet aminosyre, eventuelt A, C, F, G, I, L, M, N, P, Q, S, T, V eller W, og eventuelt hvor mønsteret er til stede i polypeptidet i posisjoner som tilsvarer posisjonene 181 til 185 til SEQ ID NO: 1.
20
3. Sammensetningen ifølge krav 2, hvor mønsteret omfatter sekvensen HEIGH eller HELGH, fortrinnsvis HELGH.
4. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene hvor
25 polypeptidet omfatter mønsteret abxHEbbHbc, hvor:
 - (a) a er aminosyre V, T eller G;
 - (b) b er en uladet aminosyre, eventuelt A, C, F, G, I, L, M, N, P, Q, S, T, V eller W;
 - (c) x er en hvilken som helst aminosyre; og
 - (d) c er en hydrofob aminosyre, eventuelt A, C, F, I, L, M, P, V, W eller Y;
30 eventuelt hvor mønsteret omfatter sekvensen GMAHELGHGL eller GVAHELGHNF, fortrinnsvis GMAHELGHGL.
5. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene hvor polypeptidet
35 (a) inkluderer et ytterligere metionin ved N-enden og/eller en His-tag ved C-enden, merket kan kobles til C-enden med et bindeledd, eventuelt hvor polypeptidet omfatter eller består av aminosyresekvensen til SEQ ID NO: 2; eller

(b) er tilveiebrakt i løsning, lyofilisert eller immobilisert, eventuelt hvori Am 1757 er et polypeptid som består av SEQ ID NO: 11 og/eller hvori Am0707 er et polypeptid som består av SEQ ID NO: 14.

- 5 6. Fremgangsmåte for å hydrolysere et O-glykoprotein, hvori fremgangsmåten omfatter å bringe en prøve omfattende O-glykoproteinet i kontakt med en sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5 og derved hydrolysere O-glykoproteinet, eventuelt videre omfattende deteksjonen eller analysen av hydrolyseprodukter.
- 10 7. Fremgangsmåte for å vurdere glykosyleringsstatusen til et protein, omfattende å bringe en prøve omfattende proteinet i kontakt med en sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5 og å detektere og/eller analysere produktene produsert, eventuelt hvori tilstedeværelsen eller fraværet av spaltningsprodukter anvendes til å bestemme tilstedeværelsen eller fraværet av et O-glykoprotein i prøven, og/eller hvori
- 15 analysen utføres for å identifisere typen av en O-glykankjede og/eller dens bindingsposisjon til et O-glykoprotein.
8. Fremgangsmåte ifølge krav 6 eller 7, hvori analysen eller deteksjonen utføres ved affinitetskromatografi, SDS-PAGE, HPLC eller massespektrometri.
- 20 9. Sammensetning omfattende et polypeptid som er i stand til å binde seg til et O-glykan eller O-glykoprotein og som mangler eller har redusert endoproteaseaktivitet spesifikk for O-glykosylerte proteiner omfattende en aminosyresekvens til SEQ ID NO: 5 eller SEQ ID NO: 20, hvori sammensetningen videre omfatter en sialidase Am1757 eller
- 25 en blanding av Am1757 og Am0707, hvori Am1757 er et polypeptid av et hvilket som helst av SEQ ID NO: 9 til 11 og Am0707 er et polypeptid av et hvilket som helst av SEQ ID NO: 12 til 14.
10. Sammensetningen ifølge krav 9, hvori polypeptidet:
- 30 (a) inkluderer et ytterligere metionin ved N-enden og/eller en His-tag ved C-enden, merket kan kobles til C-enden med et bindeledd, eventuelt hvori polypeptidet omfatter eller består av aminosyresekvensen til SEQ ID NO: 6 eller 21; og/eller
- (b) er tilveiebrakt i løsning, lyofilisert eller immobilisert.
- 35 11. Fremgangsmåte for binding til et O-glykan, O-glykopeptid og/eller O-glykoprotein hvori fremgangsmåten omfatter å bringe en prøve omfattende O-glykanet, O-glykopeptidet og/eller O-glykoproteinet i kontakt med en sammensetning ifølge krav 9 eller 10 og eventuelt å bestemme hvorvidt eller ikke et O-glykan, O-glykopeptid og/eller

O-glykoprotein er blitt bundet og/eller å separere O-glykanet og et hvilket som helst koblet glykoprotein, O-glykopeptidet eller O-glykoproteinet fra den resulterende blandingen; eventuelt hvori fremgangsmåten er for det formål å isolere et O-glykan eller koblet glykoprotein, O-glykopeptid eller O-glykoprotein fra prøven.

5

12. Fremgangsmåte for å vurdere glykosyleringsstatusen til et protein, omfattende å bringe en prøve omfattende proteinet i kontakt med en sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 9 eller 10 og å bestemme hvorvidt eller ikke proteinet er bundet av polypeptidet.

10

13. Fremgangsmåte for å detektere O-glykopeptider og/eller O-glykoproteiner i en prøve, hvori fremgangsmåten omfatter:

(a) å bringe prøven i kontakt med en sammensetning ifølge krav 9 eller 10 for derved å tillate dannelsen av kompleks mellom et O-glykopeptid og/eller O-glykoprotein og polypeptidet;

15

(b) eventuelt separere polypeptidet fra den kontaktede prøven; og

(c) å bestemme hvorvidt det separerte polypeptidet er bundet til et O-bundet glykoprotein eller glykopeptid, for derved å bestemme nærværet eller fraværet av O-koblede glykopeptider eller glykoproteiner i prøven.

20

14. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 11 til 13,

(a) hvori bestemmelsen og/eller separeringen utføres ved affinitetskromatografi, SDS-PAGE, HPLC, lektinblotting, ELISA eller massespektrometri; og/eller

(b) som i tillegg omfatter et trinn med eluering av bundet materiale fra polypeptidet ifølge krav 10 eller 11 med en buffer omfattende:

25

(a) høy molar konsentrasjon av urea;

(b) høy konsentrasjon av vaskemiddel; eller

(c) et polypeptid som har endoproteaseaktivitet spesifikk for O-glykosylerte proteiner ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5.