



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3645553 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 14/315 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2023.07.03
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2023.03.15
(86)	European Application Nr.	18749636.9
(86)	European Filing Date	2018.06.27
(87)	The European Application's Publication Date	2020.05.06
(30)	Priority	2017.06.27, US, 201762525708 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
	Designated Validation States:	KH ; MA ; MD ; TN
(73)	Proprietor	Regeneron Pharmaceuticals, Inc., 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591, USA
(72)	Inventor	SABIN, Leah, c/o Regeneron Pharmaceuticals Inc. 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown New York 10591, USA SCHOENHERR, Christopher, c/o Regeneron Pharmaceuticals Inc. 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown New York 10591, USA ECONOMIDES, Aris N., c/o Regeneron Pharmaceuticals Inc. 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown New York 10591, USA KYRATSOUS, Christos, c/o Regeneron Pharmaceuticals Inc. 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown New York 10591, USA MURPHY, Andrew J., c/o Regeneron Pharmaceuticals Inc. 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown New York 10591, USA
(74)	Agent or Attorney	ZACCO NORWAY AS, Postboks 488, 0213 OSLO, Norge

(54)	Title	TROPISM-MODIFIED RECOMBINANT VIRAL PARTICLES AND USES THEREOF FOR THE TARGETED INTRODUCTION OF GENETIC MATERIAL INTO HUMAN CELLS
(56)	References Cited:	WO-A1-2019/169144, EP-A1- 3 758 725, WO-A2-2014/108484, WO-A1-2016/011291, WO-A1-2016/112921 MÜNCH R.C. ET AL.: "Displaying high-affinity ligands on adeno-associated viral vectors enables tumor cell-specific and safe gene transfer.", MOL. THERAPY, vol. 21, no. 1, January 2013 (2013-01), pages 109-118+sup, XP002785102, SANTIAGO-ORTIZ JORGE L ET AL: "Adeno-associated virus (AAV) vectors in cancer gene therapy", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 240, 12 January 2016 (2016-01-12), pages 287-301, XP029759411, ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/J.JCONREL.2016.01.001

- CHAMOUN-EMANUELLI A.M. ET AL.: "In vitro incorporation of a cell-binding protein to lentiviral vector using an engineered split intein enables targeted delivery of genetic cargo.", *BIOTECH. BIOENGINE.*, vol. 112, no. 12, 12 August 2015 (2015-08-12), pages 2611-2617+sup, XP002785101,
- CHEN Z.C., KASARANENI N. & CHAMOUN-EMANUELLI A.M.: "Stable in vitro reprogramming of lentiviral vectors for target delivery of genetic cargo", *MOL. THERAPY*, vol. 24, no. S1, 602, May 2016 (2016-05), page S239, XP002785100,
- BUCHHEIT A.D. ET AL.: "An Oncolytic Measles Virus Engineered to Enter Cells Through the CD20 Antigen", *MOL. THER.*, vol. 7, no. 1, January 2003 (2003-01), pages 62-72, XP002787497,
- RIED M.U. ET AL.: "Adeno-Associated Virus Capsids Displaying Immunoglobulin-Binding Domains Permit Antibody-Mediated Vector Retargeting to Specific Cell Surface Receptors", *J. VIROL.*, vol. 76, no. 9, May 2002 (2002-05), pages 4559-4566, XP002785103,
- V. W. VAN BEUSECHEM ET AL: "Efficient and Selective Gene Transfer into Primary Human Brain Tumors by Using Single-Chain Antibody-Targeted Adenoviral Vectors with Native Tropism Abolished", *JOURNAL OF VIROLOGY*, vol. 76, no. 6, 15 March 2002 (2002-03-15) , pages 2753-2762, XP055004358, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.76.6.2753-2762.2002
- KEEBLE A.H. ET AL.: "Evolving accelerated amidation by SpyTag/SpyCatcher to analyze membrane dynamics", *ANGEW. CHEM. INT. ED.*, vol. 56, December 2017 (2017-12), pages 16521-16525, XP002785104,
- WICKHAM T J ET AL: "TARGETED ADENOVIRUS-MEDIATED GENE DELIVERY TO T CELLS VIA CD3", *JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US*, vol. 71, no. 10, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 7663-7669, XP002935954, ISSN: 0022-538X
- LIMIN CAO ET AL: "Characterization of a single-chain variable fragment (scFv) antibody directed against the human asialoglycoprotein receptor", *BIOTECHNOLOGY AND APPLIED BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, US*, vol. 44, no. 2, 1 May 2006 (2006-05-01), pages 65-72, XP002643344, ISSN: 0885-4513, DOI: 10.1042/BA20050081 [retrieved on 2010-12-23]
- KASARANENI N. ET AL.: "Retargeting lentiviruses via spycatcher-spytag chemistry for gene delivery into specific cell types.", *MBIO*, vol. 8, no. 6, 12 December 2017 (2017-12-12), pages E01860-17, XP002785105,
- SYED S.K. ET AL.: "Ectonucleotidase NDPDase3 is abundant in pancreatic beta-cells and regulates glucose induced insulin secretion.", *AM. J. ENDOCRINOL. METAB.*, vol. 305, 2013, pages E1319-E1326, XP002787496,
- KASHENTSEVA E A ET AL: "Adenovirus targeting to c-erbB-2 oncoprotein by single-chain antibody fused to trimeric form of adenovirus receptor ectodomain", *CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US*, vol. 62, no. 2, 15 January 2002 (2002-01-15), pages 609-616, XP002227912, ISSN: 0008-5472
- GIANLUCA VEGGIANI ET AL: "Programmable polyproteins built using twin peptide superglues", *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES*, vol. 113, no. 5, 19 January 2016 (2016-01-19), pages 1202-1207, XP055295991, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1519214113
- VEGGIANI G , ZAKERI B. & HOWARTH M.: "Superglue from bacteria: unbreakable bridges for protein nanotechnology", *TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB*, vol. 32, no. 10, 26 August 2014 (2014-08-26), pages 506-512, XP029064532, ISSN: 0167-7799, DOI: 10.1016/J.TIBTECH.2014.08.001
- MIHARU KOBAYASHI ET AL: "Ovarian cancer cell invasiveness is associated with discordant exosomal sequestration of Let-7 miRNA and miR-200", *JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE, BIOMED CENTRAL*, vol. 12, no. 1, 4, 6 January 2014 (2014-01-06), XP021174598, ISSN: 1479-5876, DOI: 10.1186/1479-5876-12-4
- XIE H., NOTKINS A.L. & LAN M.S.: "IA-2, a Transmembrane Protein Tyrosine Phosphatase, Is Expressed in Human Lung Cancer Cell Lines with Neuroendocrine Phenotype", *CANCER RES.*, vol. 56, 15 June 1996 (1996-06-15), pages 2742-2744, XP002787498,

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 viralt kapsidprotein, som er genetisk modifisert til å vise en heterolog aminosyresekvens som omfatter et første ledd av et protein:protein-bindingspar som er satt inn i det virale kapsidprotein,

5 hvor det virale kapsidprotein er avledet fra et *cap*-gen av et adenoassosiert virus (AAV) som koder for et AAV VP1-, VP2- og/eller VP3-kapsidprotein; hvor:

 (a) det første ledd av protein:protein-bindingsparet er en peptid-tag og er i stand til å danne en isopeptidbinding med et andre beslektet ledd av protein:protein-bindingsparet; eller

10

 (b) det første ledd av protein:protein-bindingsparet er en peptid-tag og det virale kapsidprotein videre omfatter det andre beslektede ledd av protein:protein-bindingsparet, hvor det første ledd og det andre beslektede ledd er bundet av en isopeptidbinding.

15

2. Rekombinant viralt kapsidprotein ifølge krav 1, hvor det virale kapsidprotein videre omfatter det andre beslektede ledd av protein:protein-bindingsparet, hvor det første ledd og det andre beslektede ledd er bundet av en isopeptidbinding.

20 **3.** Rekombinant viralt kapsidprotein ifølge krav 1 eller krav 2, hvor det virale kapsidprotein er avledet fra et kimært AAV *cap*-gen.

4. Rekombinant viralt kapsidprotein ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor det virale kapsidprotein videre omfatter en mutasjon i tillegg til det første ledd av protein:protein-bindingsparet.

25

5. Rekombinant viralt kapsidprotein ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor:

 (a) det første ledd reduserer eller opphever kapsidproteinets naturlige tropisme; og/eller

30

(b) det virale kapsidprotein videre omfatter en mutasjon i tillegg til det første ledd av protein:protein-bindingsparet, som reduserer eller opphever kapsidproteinets naturlige tropisme.

5 **6.** Rekombinant viralt kapsidprotein ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor:

- 10 (a) det første ledd flankeres av en første og/eller andre linker som forbinder det første ledd med det virale kapsidprotein, og hvor den første og/eller andre linker uavhengig av hverandre har en lengde på i det minste én aminosyre;
- 15 (b) det virale kapsidprotein videre omfatter en mutasjon på en aminosyreposisjon som er involvert i å binde det virale kapsidprotein til dets naturlige reseptor, hvor mutasjonen omfatter en insersjon av et heterologt peptid i kapsidproteinet, substitusjon av én eller flere aminosyrer av kapsidproteinet med et heterologt peptid, delesjon av én eller flere aminosyrer av kapsidproteinet, eller en kombinasjon derav;
- 20 (c) AAV-et velges fra gruppen bestående av AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 og AAV9;
- 25 (d) protein:protein-bindingsparet er:
 (i) SpyTag:SpyCatcher,
 (ii) SpyTag:KTag,
 (iii) Isopeptag:pilin-C,
 (iv) SnoopTag:SnoopCatcher,
 (v) SpyTag002:SpyCatcher002; eller
 (e) en hvilken som helst kombinasjon av (a)-(d).

7. Rekombinant viralt kapsidprotein ifølge krav 5 eller 6, hvor det virale kapsidproteins tropisme er:

- 30 (a) gjenopprettet;
 (b) omdirigert; eller
 (c) gjenopprettet og omdirigert,

etter dannelse av isopeptidbindingen med det andre beslektede ledd, hvor det andre beslektede ledd fusjoneres med en targeting-ligand som spesifikt binder en

EP 3645553

3

målcelle.

8. Rekombinant viralt kapsidprotein ifølge et hvilket som helst av kravene 2-7, hvor:

- 5 (a) det første ledd er SpyTag og det andre beslektede ledd er SpyCatcher eller KTag;
 (b) det første ledd er KTag og det andre beslektede ledd er SpyTag;
 (c) det første ledd er SnoopTag og det andre beslektede ledd er SnoopCatcher;
10 (d) det første ledd er isopeptag og det andre beslektede ledd er Pilin-C; eller
 (e) det første ledd er SpyTag002 og det andre beslektede ledd er SpyCatcher002.

15 **9.** Rekombinant viralt kapsidprotein ifølge et hvilket som helst av kravene 2-7, hvor det andre beslektede ledd er forbundet med en targeting-ligand.

10. Rekombinant viralt kapsidprotein ifølge krav 9, hvor:

- (a) targeting-liganden er en bindingsenhet;
20 (b) targeting-liganden er et antistoff eller en del derav;
 (c) targeting-liganden omfatter en aminosyresekvens ifølge SEQ ID NO:46;
 (d) targeting-liganden spesifikt binder et celleoverflatemolekyl; eller
 (e) en hvilken som helst kombinasjon av (a)-(d).

25 **11.** Rekombinant viralt kapsidprotein ifølge krav 10, hvor bindingsenheten er et antistoff eller en del derav, hvor:

- (a) antistoffet eller delen derav er fusjonert med SpyCatcher;
 (b) antistoffet eller delen derav er fusjonert med SpyCatcher, hvor antistoffet eller delen derav er fusjonert med en linker på C-terminalen, og
30 linkeren er fusjonert med SpyCatcher på linkerens C-terminal; eller
 (c) antistoffet eller delen derav er fusjonert med SpyCatcher, hvor antistoffet eller delen derav er fusjonert med en linker på C-terminalen, og linkeren er

fusjonert med SpyCatcher på linkerens C-terminal, hvor linkeren omfatter en sekvens ifølge SEQ ID NO:48 (GSGESG).

- 12.** Rekombinant viralt kapsidprotein ifølge krav 10, hvor targeting-liganden
- 5 spesifikt binder et celleoverflatemolekyl som er:
- (i) asialoglykoprotein 1 (ASGR1),
 - (ii) human ektonukleosid-trifosfat-difosfohydrolase 3 (ENTPD3),
 - (iii) PTPRN,
 - (iv) CD20,
 - 10 (v) CD63,
 - (vi) Her2; eller
 - (vii) transferrin-reseptor 2.
- 13.** Rekombinant viralt kapsidprotein ifølge krav 10, hvor:
- 15 (a) targeting-liganden spesifikt binder et molekyl som uttrykkes av en nevronal celle; eller
- (b) targeting-liganden spesifikt binder den av en nevronal celle uttrykte transferrin-reseptor.
- 20 **14.** Rekombinant viralt kapsidprotein ifølge krav 10, hvor targeting-liganden spesifikt binder et molekyl som uttrykkes av en muskelcelle.
- 15.** Rekombinant viralkapsid, omfattende det virale kapsidprotein ifølge et hvilket som helst av kravene 1-14.
- 25 **16.** Rekombinant viralt kapsid ifølge krav 15, hvor det virale kapsidprotein videre omfatter et viralt referanse-kapsidprotein som mangler et hvilket som helst ledd av det spesifikke bindingspar.
- 30 **17.** Rekombinant viralt kapsid ifølge krav 16, omfattende det virale kapsidprotein og det virale referanse-kapsidprotein i et forhold på mellom 1:1 og 1:15.

18. Rekombinant viral partikkel, omfattende et nukleotid av interesse som er innkapslet ved hjelp av det virale kapsidprotein ifølge et hvilket som helst av kravene 15-17.

- 5 **19.** Sammensetning som omfatter: (a) det virale kapsidprotein ifølge et hvilket som helst av kravene 15-17 eller den virale partikkel ifølge krav 18; og (b) en farmasøytisk akseptert bærer.

- 10 **20.** Viral partikkel ifølge krav 18 eller sammensetning ifølge krav 19 for anvendelse i en fremgangsmåte for tilførsel av et nukleotid av interesse til en målcelle, omfattende å bringe målcellen i kontakt med nevnte virale partikkel eller nevnte sammensetning, hvor det virale kapsidprotein omfatter en targeting-ligand som spesifikt binder et på overflaten av målcellen uttrykt protein.

- 15 **21.** Viral partikkel eller sammensetning for anvendelse i fremgangsmåten ifølge krav 20, hvor:
- (a) målcellen er *in vivo* i et subjekt;
 - (b) målcellen er *in vivo* i et humant subjekt; og/eller
 - (c) målcellen er en human målcelle.

20

- 22.** Viral partikkel eller sammensetning for anvendelse i fremgangsmåten ifølge krav 21, hvor:

- (i) målcellen er en human levercelle, og hvor targeting-liganden binder human asialoglykoprotein-reseptor (ASGR1);
- 25 (ii) målcellen er en human nevronal celle, og hvor targeting-liganden binder GABA;
- (iii) målcellen er en human T-celle, og hvor targeting-liganden binder CD3;
- (iv) målcellen er en human T-celle, og hvor targeting-liganden binder CD3ε;
- (v) målcellen er en human hematopoietisk celle, og hvor targeting-liganden
- 30 binder CD34;
- (vi) målcellen er en human nyrecelle;
- (vii) målcellen er en human kreftcelle, og hvor targeting-liganden binder et tumorassosiert antigen; eller

(viii) målcellen er en human kreftcelle, og hvor targeting-liganden binder et tumorassosiert antigen, hvor tumorantigenet er E6, E7 eller Her2.

23. Viral partikkel eller sammensetning for anvendelse i fremgangsmåten ifølge

5 krav 21, hvor:

- (i) targeting-liganden binder PTPRN (protein-tyrosin-fosfatase-reseptor-Type N);
- (ii) targeting-liganden binder CD20;
- (iii) targeting-liganden binder human glukagon-reseptor; eller
- 10 (iv) targeting-liganden spesifikt binder CD63 eller human ektonukleosid-trifosfat-difosfohydrolase 3 (hENTPD3).

24. Fremgangsmåte for tilførsel av et nukleotid av interesse til en *in vitro*-målcelle, omfattende å bringe målcellen i kontakt med den virale partikkel ifølge krav 18
15 eller sammensetningen ifølge krav 19, hvor det virale kapsidprotein omfatter en targeting-ligand som spesifikt binder et protein som uttrykkes på overflaten av målcellen.

25. Fremgangsmåte ifølge krav 24, hvor:

- 20 (i) målcellen er en human levercelle, og hvor targeting-liganden binder human asialoglykoprotein-reseptor (ASGR1);
- (ii) målcellen er en human nevronal celle, og hvor targeting-liganden binder GABA;
- (iii) målcellen er en human T-celle, og hvor targeting-liganden binder CD3;
- 25 (iv) målcellen er en human T-celle, og hvor targeting-liganden binder CD3ε;
- (v) målcellen er en human hematopoietisk celle, og hvor targeting-liganden binder CD34;
- (vi) målcellen er en human nyrecelle;
- (vii) målcellen er en human kreftcelle, og hvor targeting-liganden binder et
- 30 tumorassosiert antigen; eller
- (viii) målcellen er en human kreftcelle, og hvor targeting-liganden binder et tumorassosiert antigen, hvor tumorantigenet er E6, E7 eller Her2.

EP 3645553

7

26. Fremgangsmåte ifølge krav 24, hvor:

- (i) targeting-liganden binder PTPRN;
- (ii) targeting-liganden binder CD20;
- (iii) targeting-liganden binder human glukagon-reseptor; eller
- 5 (iv) targeting-liganden spesifikt binder CD63hENTPD3; eller
- (v) targeting-liganden spesifikt binder transferrinreseptor 2.

27. Rekombinant vektor som koder for det virale kapsidprotein ifølge et hvilket som helst av kravene 1-14.

10

28. AAV *cap*-gen som koder for det rekombinante virale kapsidprotein ifølge et hvilket som helst av kravene 1-14.