

(19)



SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10)

FI/EP3894549 T3

(12)

**EUROOPPAPATENTIN KÄÄNNÖS
ÖVERSÄTTNING AV EUROPEISKT PATENT
TRANSLATION OF EUROPEAN PATENT SPECIFICATION**

(45)

Käännöksen kuulutuspäivä - Kungörelsedag av översättning -
Translation available to the public

23.10.2024

(97)

Eurooppapatentin myöntämispäivä - Meddelandedatum för
det europeiska patentet - Date of grant of European patent

31.07.2024

(51)

Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassificering -
International patent classification
C12N 9/22 (2006 . 01)
C12N 15/85 (2006 . 01)
C12N 15/90 (2006 . 01)

(96)

Eurooppapatenttihakemus - Europeisk patentansökan -
European patent application

EP19832777.7

(22)

Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date

09.12.2019

(97)

Patenttihakemuksen julkiseksitulosopäivä - Patentansökans
publiceringsdag - Patent application available to the public

20.10.2021

(86)

Kansainvälinen hakemus - Internationell
ansökan - International application

09.12.2019 PCT/US2019065129

(30)

Etuoikeus - Prioritet - Priority

10.12.2018 US US201862777325 P

24.10.2019 US US201962925516 P

(73)

Haltija - Innehavare - Holder

1• Amgen Inc., One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, California 91320-1799, (US)

(72)

Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1• AGRAWAL, Neeraj J., c/o Amgen Inc. Law Department Patent Operations One Amgen Center Drive M/S 28-5-A,
Thousand Oaks, California 91320-1799, (US)

2• DARIS, Kristine M., c/o Amgen Inc. Law Department Patent Operations One Amgen Center Drive M/S 28-5-A,
Thousand Oaks, California 91320-1799, (US)

3• STEVENS, Jennitte L., c/o Amgen Inc. Law Department Patent Operations One Amgen Center Drive M/S 28-5-A,
Thousand Oaks, California 91320-1799, (US)

4• LE, Huong Thi Ngoc, c/o Amgen Inc. Law Department Patent Operations One Amgen Center Drive M/S 28-5-A,
Thousand Oaks, CA 91320-1799, (US)

5• TALAVAN, Noelia Blanco, c/o Amgen Inc. Law Department Patent Operations One Amgen Center Drive M/S 28-5-A,
Thousand Oaks, CA 91320-1799, (US)

(74)

Asiamies - Ombud - Agent

Papula Oy, P.O.Box 981, 00101 Helsinki, (FI)

(54)

Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

**MUTATOITU PIGGYBAC-TRANSPOSAASI
MUTATED PIGGYBAC TRANSPOSASE**

PATENTTIVAATIMUKSET

1. PiggyBac-transposaasi:

5 (i) joka käsittää isoleusiinin substituution leusiinilla SEQ ID nro 2:n kohdassa 147, isoleusiinin substituution leusiinilla SEQ ID nro 2:n kohdassa 247 ja seriinin substituution treoniinilla SEQ ID nro 2:n kohdassa 533; ja/tai

10 (ii) jolla on SEQ ID nro 4:n, SEQ ID nro 6:n, SEQ ID nro 8:n, SEQ ID nro 10:n, SEQ ID nro 12:n, SEQ ID nro 14:n tai SEQ ID nro 16:n aminohapposekvenssi.

2. Muokattu nukleiinihappomolekyyli, joka koodittaa patenttivaatimuksen 1 mukaista piggyBac-transposaasia, valinnaisesti jossa nukleiinihappomolekyyli on valittu DNA:sta tai mRNA:sta.

3. Vektori, joka käsittää nukleiinihappomolekyylin, joka koodittaa patenttivaatimuksen 2 mukaista piggyBac-transposaasia.

20 4. Vektori, joka käsittää nukleiinihappomolekyylin, joka koodittaa patenttivaatimuksen 3 mukaista piggyBac-transposaasia, vektorin käsittäessä lisäksi ainakin yhtä tutkittavaa proteiinia koodittavan ainakin yhden nukleiinihapposekvenssin, jota reunustaa ainakin piggyBac-transposonin käänteiset 5'- ja 3'-toistojaksot, valinnaisesti jossa vektori käsittää yhden tai useamman nukleiinihapposekvenssin, joka koodittaa (jotka koodittavat) yhtä tai useampaa tutkittavaa proteiinia.

25 5. Solu, joka on transfektoitu patenttivaatimuksen 3 tai patenttivaatimuksen 4 mukaisella vektorilla tai patenttivaatimuksen 2 mukaisella muokatulla nukleiinihappomolekyyllillä.

30 6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen solu, jossa solu on: (i) isäntäsolu; (ii) CHO-solu; tai (iii) immuunisolu.

7. Patenttivaatimuksen 5 mukainen solu:

- (i) joka on kotransfektoitu muokatulla nukleiinihappomolekyyllillä, joka koodittaa patenttivaatimuksen 2 mukaista piggyBac-transposasaasia, ja vektorilla, joka käsittää ainakin yhtä tutkittavaa proteiinia koodittavan ainakin yhden nukleiinihappomolekyylin, jota reunustaa ainakin piggyBac-transposonin käänteiset 5'- ja 3'-toistojaksot;
- (ii) joka on kotransfektoitu vektorilla, joka käsittää muokatun nukleiinihappomolekyylin, joka koodittaa patenttivaatimuksen 3 mukaista piggyBac-transposasaasia, ja vektorilla, joka käsittää ainakin yhtä tutkittavaa proteiinia koodittavan ainakin yhden nukleiinihappomolekyylin, jota reunustaa ainakin piggyBac-transposonin käänteiset 5'- ja 3'-toistojaksot; tai
- (iii) joka on kotransfektoitu vektorilla, joka käsittää muokatun nukleiinihappomolekyylin, joka koodittaa patenttivaatimuksen 3 mukaista piggyBac-transposasaasia ja käsittää ainakin yhtä tutkittavaa proteiinia koodittavan ainakin yhden nukleiinihappomolekyylin, jota reunustaa ainakin piggyBac-transposonin käänteiset 5'- ja 3'-toistojaksot;
- valinnaisesti jossa tutkittavan proteiinin, jota ekspressoi muokatulla piggyBac-transposasaasilla transfektoitu solu, tiitteri on parantunut verrattuna saman tutkittavan proteiinin, jota ekspressoi villityypin piggyBac-transposasaasilla transfektoitu solu tai piggyBac-transposasaasilla transfektoimaton solu, tiitteriin.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen solu, jossa tutkittava proteiini on antigeenia sitova proteiini, valinnaisesti jossa antigeenia sitova proteiini on valittu T-solureseptorista, bispesifisestä T-solusitojasta, bispesifisestä T-solusitoja-hetero-Fc:stä,

fuusioproteiinista, IgG-scFv:stä tai monoklonaalisesta vasta-aineesta.

9. Menetelmä isäntäsolun ekspressoiman tutkit-
tavan rekombinanttiproteiinin tiitterin parantamiseksi,
5 menetelmän käsittäessä

patenttivaatimuksen 1 mukaista piggyBac-trans-
posaasia koodittavan nukleiinihappomolekyylin
muokkaamisen stabiilisuuden parantamiseksi
isäntäsolussa;
10 isäntäsolun kotransfektoimisen muokatulla
nukleiinihappomolekyyllillä, joka koodittaa
piggyBac-transposaasia, ja vektorilla, joka
käsittää tutkittavaa proteiinia koodittavan
nukleiinihapposekvenssin, jota reunustaa aina-
15 kin piggyBac-transposonin käänteiset 5'- ja
3'-toistojaksot; ja
solujen viljelemisen tutkittavan rekombinant-
tiproteiinin ekspressoimiseksi,
jossa tutkittavan rekombinanttiproteiinin,
20 jota ekspresoi muokatulla piggyBac-transpo-
saasilla transfektoitu isäntäsolu, tiitteri
paranee verrattuna tutkittavan rekombinantti-
proteiinin, jota ekspresoi villityypin pig-
gyBac-transposaasilla transfektoitu solu tai
25 piggyBac-transposaasilla transfektoimaton
solu, tiitteriin.

10. Menetelmä rekombinanttiproteiinin tuoton
parantamiseksi rekombinanttiproteiinia ekspressoivassa
nisäkässoluviljelmässä, menetelmän käsittäessä
30 soluviljelmän muodostamisen bioreaktorissa
käyttämällä isäntäsolua, joka on kotransfek-
toitu nukleiinihappomolekyyllillä, joka koodit-
taa patenttivaatimuksen 1 mukaista piggyBac-
transposaasia, jota on muokattu stabiilisuuden
parantamiseksi isäntäsolussa, ja vektorilla,
35 joka käsittää tutkittavaa proteiinia kooditta-
van nukleiinihappomolekyylin, jota reunustaa

ainakin piggyBac-transposonin käänteiset tois-
tojaksot; ja

tutkittavan rekombinanttiproteiinin ekspres-
soimisen;

5 jossa tutkittavan rekombinanttiproteiinin,
jota ekspressoi muokatulla piggyBac-transpo-
saasilla transfektoitu isäntäsolu, tiitteri
paranee verrattuna tutkittavan rekombinantti-
proteiinin, jota ekspressoi villityypin pig-
10 gyBac-transposaasilla transfektoitu solu tai
piggyBac-transposaasilla transfektoimaton
solu, tiitteriin.

11. Menetelmä eristetyn, puhdistetun tutkitta-
van rekombinanttiproteiinin tuottamiseksi, menetelmän
15 käsittäessä

soluviljelmän muodostamisen bioreaktorissa
tutkittavaa rekombinanttiproteiinia ekspres-
soivalla isäntäsolulla, jossa solulinja on ko-
transfektoitu nukleiinihapposekvenssillä, joka
20 koodittaa patenttivaatimuksen 1 mukaista pig-
gyBac-transposaasia, jota on muokattu stabiili-
suuden parantamiseksi isäntäsolussa, ja vek-
torilla, joka käsittää tutkittavaa proteiinia
koodittavan nukleiinihapposekvenssin, jota
25 reunustaa ainakin piggyBac-transposonin käänteiset 5'- ja 3'-toistojaksot;

solujen viljelemisen tutkittavan rekombinant-
tiproteiinin ekspressoimiseksi;
tutkittavan rekombinanttiproteiinin keräämi-
30 sen,

tutkittavan rekombinanttiproteiinin käsittele-
misen yhdellä tai useammalla yksikköoperaati-
olla, ja

eristetyn, puhdistetun tutkittavan rekombi-
35 nanttiproteiinin saamisen.

12. Jonkin patenttivaatimuksista 9 - 11 mukai-
nen menetelmä, jossa:

(i) isäntäsolu transfektoidaan ensimmäisellä vektorilla, joka käsittää muokatun nukleiinihappomolekyylin, joka koodittaa piggyBac-transposaasia, ja toisella vektorilla, joka käsittää tutkittavaa proteiinia koodittavan nukleiinihapposekvenssin, jota reunustaa ainakin piggyBac-transposonin käänteiset 5'- ja 3'-toistojaksot; tai

(ii) isäntäsolu transfektoidaan yhdellä vektorilla, joka käsittää muokatun nukleiinihappomolekyylin, joka koodittaa piggyBac-transposaasia, ja tutkittavaa proteiinia koodittavan nukleiinihapposekvenssin, jota reunustaa ainakin piggyBac-transposonin käänteiset 5'- ja 3'-toistojaksot.

13. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, jossa:

(i) ainakin yksi yksikköoperaatio on sitova kromatografiavaihe, joka valitaan affiniteettikromatografiasta, ioninvaihtokromatografiasta, anioninvaihtokromatografiasta, kationinvaihtokromatografiasta, multimodaalisesta kromatografiasta, hydrofobisesta interaktiokromatografiasta ja hydroksiapatiittikromatografiasta;

(ii) ainakin yksi yksikköoperaatio on viimeistelykromatografiavaihe, joka valitaan ioninvaihtokromatografiasta, anioninvaihtokromatografiasta, kationinvaihtokromatografiasta, multimodaalisesta kromatografiasta, hydrofobisesta interaktiokromatografiasta ja hydroksiapatiittikromatografiasta;

(iii) ainakin yksi yksikköoperaatio valitaan virusinaktivaatiosta, virussuodatukselta, kerrossuodatukselta ja UF/DF:stä; tai

(iv) tutkittavan rekombinanttiproteiinin, jota ekspressoi muokatulla piggyBac-transposaasilla

transfektoitu isäntäsolu, tiitteri paranee verrattuna tutkittavan rekombinanttiproteiinin, jota ekspressoit villityypin piggyBac-transposaasilla transfektoitu solu tai piggyBac-transposaasilla transfektoimaton solu, tiitteriin.

14. Kitti solun transfektoimiseksi, kitin käsittäessä

patenttivaatimuksen 1 mukaista piggyBac-transposaasia koodittavan nukleiinihapposekvenssin, jota on muokattu stabiilisuuden parantamiseksi isäntäsolussa; ja vektorin, joka käsittää ainakin piggyBac-transposonin käänteiset 5'- ja 3'-toistojaksot, johon ainakin yhtä tutkittavaa proteiinia koodittava ainakin yksi nukleiinihapposekvenssi insertoidaan.

15. Menetelmä nonviraalisten geneettisesti modifioitujen solujen generoimiseksi, menetelmän käsittäessä:

(a) vektorin muodostamisen, joka käsittää ainakin yhtä tutkittavaa proteiinia koodittavan ainakin yhden nukleiinihapposekvenssin, jota reunustaa ainakin piggyBac-transposonin käänteiset 5'- ja 3'-toistojaksot;

(b) luovuttajasta tai kohteesta eristettyjen natiivien immuunisolujen aikaansaamisen;

(c) solujen transfektoimisen vektorilla ja patenttivaatimuksen 1 mukaista piggyBac-transposaasia koodittavalla nukleiinihapposekvenssillä, jota on muokattu stabiilisuuden parantamiseksi solussa ja;

(d) solujen lisäämisen soluviljelyllä nonviraalisten geneettisesti modifioitujen solujen suuremmaksi populaatioksi.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, jossa:

- (i) solut transfektoidaan vektorilla, joka käsittää ainakin yhtä tutkittavaa proteiinia koodittavan ainakin yhden nukleiinihapposekvenssin, jota reunustaa ainakin piggyBac-transposonin käänteiset 5'- ja 3'-toistojaksot, ja vektorilla, joka käsittää patenttivaatimuksen 1 mukaista piggyBac-transposaasia koodittavan nukleiinihapposekvenssin, jota on muokattu stabiilisuuden parantamiseksi solussa; tai
- (ii) solut transfektoidaan vektorilla, joka käsittää ainakin yhtä tutkittavaa proteiinia koodittavan ainakin yhden nukleiinihapposekvenssin, jota reunustaa ainakin piggyBac-transposonin käänteiset 5'- ja 3'-toistojaksot, ja nukleiinihapposekvenssillä, joka koodittaa patenttivaatimuksen 1 mukaista piggyBac-transposaasia, jota on muokattu stabiilisuuden parantamiseksi solussa.
17. Nonviraalinen geneettisesti modifioitu solu käytettäväksi menetelmässä kohteen hoitamiseksi, jossa menetelmä käsittää:
- (a) vektorin muodostamisen, joka käsittää ainakin yhtä tutkittavaa proteiinia koodittavan ainakin yhden nukleiinihapposekvenssin, jota reunustaa ainakin piggyBac-transposonin käänteiset 5'- ja 3'-toistojaksot;
 - (b) natiivien immuunisolujen eristämisen kohteesta tai luovuttajasta;
 - (c) solujen transfektoimisen vektorilla ja nukleiinihapposekvenssillä, joka koodittaa patenttivaatimuksen 1 mukaista piggyBac-transposaasia, jota on muokattu stabiilisuuden parantamiseksi solussa;
 - (d) solujen lisäämisen soluviljelyllä geneettisesti modifioitujen solujen suuremmaksi populaatioksi;

(e) transformoituneiden solujen eristämisen soluviljelmästä solupopulaation saamiseksi, joka käsittää geneettisesti modifioituja soluja; ja

5 (f) nonviraalisten, geneettisesti modifioitujen solujen palauttamisen kohteeseen.

18. Nonviraalinen geneettisesti modifioitu solu käytettäväksi patenttivaatimuksen 17 mukaisesti, jossa:

10 (i) solut transfektoidaan vektorilla, joka käsittää ainakin yhtä tutkittavaa proteiinia koodittavan ainakin yhden nukleiinihapposekvenssin, jota reunustaa ainakin piggyBac-transposonin käänteiset 5'- ja 3'-toistojaksot, ja vektorilla, joka käsittää patenttivaatimuksen 1 mukaista piggyBac-transposaasia koodittavan nukleiinihapposekvenssin, jota on muokattu stabiilisuuden parantamiseksi solussa; tai

20 (ii) solut transfektoidaan vektorilla, joka käsittää ainakin yhtä tutkittavaa proteiinia koodittavan ainakin yhden nukleiinihapposekvenssin, jota reunustaa ainakin piggyBac-transposonin käänteiset 5'- ja 3'-toistojaksot, ja nukleiinihapposekvenssillä, joka koodittaa patenttivaatimuksen 1 mukaista piggyBac-transposaasia, jota on muokattu stabiilisuuden parantamiseksi solussa.

25 19. Nonviraalinen geneettisesti modifioitu solu käytettäväksi patenttivaatimuksen 17 mukaisesti, jossa:

(i) natiivi immuunisolu on mononukleaarinen solu;

(ii) natiivi immuunisolu on T-solu;

35 (iii) ainakin yksi tutkittava proteiini on antigeenireseptori, T-solureseptori tai kimeerinen antigeenireseptori; tai

(iv) solu on transfektoitu myös nukleiinihappomolekyyllillä, joka koodittaa itsemurhageeniä, indusoitavaa herätys- tai kiihdytyskytkintä tai molempia.

5 20. Geneettisesti modifioitu solu käytettäväksi taudin tai häiriön hoitamisessa tai ehkäisemisessä sen tarpeessa olevassa luovuttajassa tai kohteessa, joka käsittää geneettisesti modifioidun solun tehokkaan määrän antamisen luovuttajalle tai kohteelle, jossa ge-
10 neettisesti modifioitu solu on jonkin patenttivaatimuksista 5 - 8 mukainen solu.