



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO

(10) Identifikator
dokumenta:



HR P20190706 T1

HR P20190706 T1

(12) **PRIJEVOD PATENTNIH ZAHTEVA
EUROPSKOG PATENTA**

(51) MKP:

A01K 67/027 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(46) Datum objave prijevoda patentnih zahtjeva: 18.10.2019.

(21) Broj predmeta: P20190706T

(22) Datum podnošenja zahtjeva u HR: 16.04.2019.

(86) Broj međunarodne prijave: PCT/US2014026040
Datum podnošenja međunarodne prijave: 13.03.2014.

(96) Broj europske prijave patenta: EP 14717331.4
Datum podnošenja europske prijave patenta: 13.03.2014.

(87) Broj međunarodne objave: WO 2014160202
Datum međunarodne objave: 02.10.2014.

(97) Broj objave europske prijave patenta: EP 2967013 A1
Datum objave europske prijave patenta: 20.01.2016.

(97) Broj objave europskog patenta: EP 2967013 B1
Datum objave europskog patenta: 16.01.2019.

(31) Broj prve prijave: 201313798455

(32) Datum podnošenja prve prijave: 13.03.2013.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US

(73) Nositelj patenta:

**Regeneron Pharmaceuticals, Inc., 777 Old Saw Mill River Road,
Tarrytown, NY 10591, US**

(72) Izumitelji:

Robert Babb, 292 Voorhis Avenue, River Edge, NJ 07661, US
John McWhirter, 2152 Crescent Drive, Tarrytown, NY 10591, US
Lynn MacDonald, 16 Franklin Lane, Harrison, NY 10528, US
Sean Stevens, 3954 Camino Calma, San Diego, CA 92122, US
Samuel Davis, 332 West 88th Street, Apt. B2, New York, NY 10024, US
David R. Buckler, 115 Millard Avenue, Sleepy Hollow, NY 10591, US
Karolina A. Meagher, 14 Church Street 2nd Floor, Tarrytown, NY 10591, US
Andrew J. Murphy, 10 Newton Court, Croton-on-Hudson, NY 10520, US

(74) Zastupnik:

FORINPRO d.o.o., 10000 Zagreb, HR

(54) Naziv izuma:

MIŠEVI KOJI IZRAŽAVAJU OGRANIČENI REPERTOAR LAKOG LANCA IMUNOGLOBULINA

HR P20190706 T1

PATENTNI ZAHTEJEVI

1. Miš koji u svojem genomu zametnih stanica sadrži:

dva humana imunoglobulinska segmenta gena V_{κ} i pet humanih imunoglobulinskih segmenata gena J_{κ} operativno povezanih sa sekvencom konstantne regije lakog lanca mišjeg ili štakorskog imunoglobulina, pri čemu su dva humana imunoglobulinska segmenta gena V_{κ} humani $V_{\kappa 1-39}$ i humani $V_{\kappa 3-20}$, a pet humanih imunoglobulinskih segmenata gena J_{κ} su humani $J_{\kappa 1}$, humani $J_{\kappa 2}$, humani $J_{\kappa 3}$, humani $J_{\kappa 4}$ i humani $J_{\kappa 5}$; i jedan ili više humanih imunoglobulinskih segmenata gena V_H , jedan ili više humanih segmenata gena D_H te jedan ili više humanih imunoglobulinskih segmenata gena J_H operativno povezanih sa sekvencom konstantne regije mišjeg ili štakorskog imunoglobulina;

naznačen time, što imunoglobulinski humani segmenti gena posjeduju sposobnost preuređivanja i šifriranja varijabilnih domena antitijela humanog imunoglobulina, te dodatno naznačen time, što miš ne sadrži endogeni imunoglobulinski segment gena V_L koji posjeduje sposobnost preuređivanja radi formiranja sekvence varijabilne regije lakog lanca imunoglobulina.

2. Miš prema patentnom zahtjevu 1, naznačen time, što

(a) dva humana segmenta gena V_{κ} i pet humanih segmenata gena J_{κ} su operativno povezani sa sekvencom konstantne regije lakog lanca mišjeg ili štakorskog imunoglobulina koja je (i) štakorska regija C_{κ} ili (ii) mišja regija C_{κ} ; i/ili

(b) dva humana segmenta gena V_{κ} i pet humanih segmenata gena J_{κ} su prisutni na endogenom lokusu lakog lanca imunoglobulina; i/ili

(c) jedan ili više humanih segmenata gena V_H , jedan ili više humanih segmenata gena D_H te jedan ili više humanih segmenata gena J_H su operativno povezani za sekvencu mišje konstantne regije; i/ili

(d) dva humana segmenta gena V_{κ} i pet humanih segmenata gena J_{κ} su operativno povezani sa sekvencom konstantne regije lakog lanca mišjeg ili štakorskog imunoglobulina te su prisutni na lokusu koji sadrži ovim redoslijedom: humani segment gena $V_{\kappa 1-39}$, humani segment gena $V_{\kappa 3-20}$, humani $J_{\kappa 1}$, humani $J_{\kappa 2}$, humani $J_{\kappa 3}$, humani $J_{\kappa 4}$ i humani $J_{\kappa 5}$; i/ili

(e) miš sadrži lokus lakog lanca koji sadrži ovim redoslijedom: humani segment gena $V_{\kappa 1-39}$, humani segment gena $V_{\kappa 3-20}$, humani $J_{\kappa 1}$, humani $J_{\kappa 2}$, humani $J_{\kappa 3}$, humani $J_{\kappa 4}$ i humani $J_{\kappa 5}$, pri čemu lokus lakog lanca sadrži čvorišnu sekvencu $hV_{\kappa}/hJ_{\kappa}/mC_{\kappa}$ odabranu iz SEQ ID NO: 38-49; i/ili

(f) miš je imuniziran.

3. Miš prema patentnom zahtjevu 1 ili 2, naznačen time, što miš sadrži funkcionalni ili nefunkcionalni lokus lakog lanca λ .

4. Izolirana mišja stanica prema bilo kojem od prethodnih patentnih zahtjeva, naznačena time, što:

(a) stanica je embrionalna matična (ES) stanica; ili

(b) stanica je B stanica.

5. Mišji embrij koji sadrži ES stanicu prema patentnom zahtjevu 4(a).

6. Hibridom dobiven pomoću B stanice iz patentnog zahtjeva 4(b).

7. Upotreba miša prema bilo kojem patentnom zahtjevu od 1 do 3 u svrhu:

(a) dobivanja antitijela; i/ili

(b) identifikacije sekvence nukleinske kiseline koja šifrira varijabilnu domenu teškog lanca humanog imunoglobulina; i/ili

(c) dobivanja humanog bispecifičnog antitijela; i/ili

(d) odabira segmenta gena varijabilne regije teškog lanca humanog imunoglobulina.

8. Metoda za dobivanje antitijela koje se vezuje za interesni antigen koja se sastoji od imunizacije miša prema bilo kojem patentnom zahtjevu od 1 do 3 pomoću interesnog antigena, dobivanja sekvence varijabilne regije imunoglobulina iz miša te upotrebe sekvence varijabilne regije imunoglobulina za dobivanje antitijela koje se vezuje za antigen, poželjno pri čemu se metoda dodatno sastoji od:

izražavanja u jednoj stanici:

(a) prve sekvence varijabilne regije teškog lanca humanog imunoglobulina iz miša prema bilo kojem patentnom zahtjevu od 1 do 3 koji je imuniziran, pri čemu je sekvenca varijabilne regije teškog lanca humanog imunoglobulina spojena s humanom sekvencom gena C_H ; i

(b) sekvence varijabilne regije lakog lanca humanog imunoglobulina, pri čemu je sekvenca varijabilne regije lakog lanca humanog imunoglobulina spojena sa sekvencom konstantne regije lakog lanca humanog imunoglobulina;

održavanja stanice u uvjetima koji su prikladni za izražavanje potpuno humanog antitijela; i izoliranja antitijela iz stanice.

9. Metoda prema patentnom zahtjevu 8, naznačena time, što stanica sadrži drugu sekvencu varijabilne regije teškog lanca humanog imunoglobulina iz miša prema bilo kojem patentnom zahtjevu od 1 do 3 koji je imuniziran, pri čemu je sekvenca varijabilne regije teškog lanca humanog imunoglobulina spojena sa sekvencom konstantne regije teškog lanca humanog imunoglobulina, pri čemu prva sekvenca varijabilne regije teškog lanca humanog imunoglobulina šifrira prvu varijabilnu domenu teškog lanca humanog imunoglobulina koja prepoznaje prvi epitop, a druga sekvenca varijabilne regije teškog lanca humanog imunoglobulina šifrira drugu varijabilnu domenu

teškog lanca humanog imunoglobulina koja prepoznaje drugi epitop, pri čemu prvi epitop i drugi epitop nisu identični, a prva i druga varijabilna domena teškog lanca humanog imunoglobulina stupaju u interakciju s varijabilnom domenom lakog lanca humanog imunoglobulina koju šifrira sekvenca varijabilne regije lakog lanca humanog imunoglobulina.

- 5 10. Metoda za dobivanje humanog bispecifičnog antitijela, naznačena time, što se metoda sastoji od imunizacije miša prema bilo kojem patentnom zahtjevu od 1 do 3 i dobivanja bispecifičnog antitijela pomoću sekvenci varijabilne regije humanog imunoglobulina B stanica iz miša, poželjno naznačena time, što se metoda dodatno sastoji od:
 - (a) identifikacije klonalno odabranog limfocita miša prema bilo kojem patentnom zahtjevu od 1 do 3, pri čemu je miš imuniziran i dozvoljeno mu je da razvije imunološki odgovor na interesni antigen, pri čemu
 - 10 (b) dobivanja nukleotidne sekvence iz limfocita ili antitijela koja šifrira varijabilnu domenu teškog lanca humanog imunoglobulina koja se specifično vezuje za interesni antigen; i
 - (c) upotrebljavanja nukleotidne sekvence iz (b) u proizvodnji bispecifičnog antitijela.
- 15 11. Metoda prema patentnom zahtjevu 10, naznačena time, što se koraci od (a) do (c) po prvi put obavljaju za prvi interesni antigen radi dobivanja prve sekvence varijabilne regije teškog lanca humanog imunoglobulina, a zatim se koraci od (a) do (c) obavljaju po drugi put za drugi interesni antigen radi dobivanja druge sekvence varijabilne regije teškog lanca humanog imunoglobulina, te naznačena time, što se prva sekvenca varijabilne regije teškog lanca humanog imunoglobulina izražava s prvom sekvencom konstantne regije teškog lanca humanog imunoglobulina radi formiranja prvog teškog lanca humanog imunoglobulina, a druga sekvenca varijabilne regije
- 20 teškog lanca humanog imunoglobulina se izražava s drugom sekvencom konstantne regije teškog lanca humanog imunoglobulina radi formiranja drugog teškog lanca humanog imunoglobulina, pri čemu se prvi i drugi teški lanac humanog imunoglobulina izražavaju u prisustvu jednog lakog lanca humanog imunoglobulina koji sadrži humanu regiju V_L dobivenu iz preuređene sekvence humanog lakog lanca koja sadrži humani segment gena Vκ1-39 ili humani segment gena Vκ3-20.
- 25 12. Metoda prema patentnom zahtjevu 11, naznačena time, što se metoda sastoji od:
 - (a) kloniranja sekvenci varijabilne regije teškog lanca humanog imunoglobulina iz B stanica iz:
 - (i) miša prema bilo kojem patentnom zahtjevu od 1 do 3 koji je imuniziran prvim imunogenom; i
 - (ii) istog miša, ili drugog miša koji je genetski isti, koji je imuniziran drugim imunogenom;
 - (b) izražavanja u stanici sekvence varijabilne regije teškog lanca humanog imunoglobulina iz (a) sa
 - 30 sekvencom konstantne regije teškog lanca humanog imunoglobulina i lakim lancem istog imunoglobulina radi dobivanja bispecifičnog antitijela, poželjno naznačeno time, što prvi teški lanac humanog imunoglobulina sadrži modifikaciju koja eliminira ili u značajnoj mjeri smanjuje afinitet prvog teškog lanca humanog imunoglobulina za vezivanje s proteinom A, a drugi teški lanac humanog imunoglobulina zadržava sposobnost vezivanja za protein A, pri čemu je modifikacija koja eliminira ili u značajnoj mjeri
 - 35 smanjuje afinitet prvog teškog lanca humanog imunoglobulina za vezivanje s proteinom A odabrana iz: 95R (EU 435R), 96F (EU 436F) i njihove kombinacije.
13. Metoda za proizvodnju antitijela koja se sastoji od imunizacije miša prema bilo kojem patentnom zahtjevu od 1 do 3 pomoću antigena i dobivanja aminokiselinske sekvence varijabilne domene teškog lanca humanog imunoglobulina ili šifriranja nukleotidne sekvence, iz nastalog antitijela koje proizvodi miš protiv antigena, te
- 40 korištenja spomenute aminokiselinske sekvence varijabilne domene teškog lanca humanog imunoglobulina ili šifriranja sekvence nukleinske kiseline za dobivanje antitijela, poželjno naznačeno time što se metoda dodatno sastoji od:
 - (a) identifikacije aminokiselinske sekvence varijabilne domene teškog lanca humanog imunoglobulina ili šifriranja nukleotidne sekvence, iz dva različita antitijela protiv različitih epitopa kojima je miš
 - 45 imuniziran; ili
 - (b) imunizacije istog miša ili dodatnog miša prema bilo kojem patentnom zahtjevu od 1 do 3, pomoću drugog antigena, a zatim identifikacije aminokiselinske sekvence varijabilne domene teškog lanca humanog imunoglobulina ili šifriranja nukleotidne sekvence, iz antitijela koje je proizveo miš koje je specifično za
 - 50 spomenuti različiti antigen,
 pri čemu se metoda dodatno sastoji od korištenja dvije različite aminokiselinske sekvence varijabilne domene teškog lanca humanog imunoglobulina ili šifriranja nukleotidnih sekvenci radi proizvodnje bispecifičnog antitijela.
14. Metoda prema patentnom zahtjevu 13, naznačena time, što se metoda dodatno sastoji od
 - (a) identifikacije aminokiselinske sekvence varijabilne domene lakog lanca humanog imunoglobulina, iz antitijela ili dva antitijela; i/ili
 - 55 (b) korištenja aminokiselinske sekvence varijabilne domene lakog lanca humanog imunoglobulina i/ili aminokiselinskih sekvenci varijabilne domene teškog lanca humanog imunoglobulina identificiranih u antitijelu dobivenom pomoću predmetne metode radi proizvodnje bispecifičnog antitijela.