



(12) Translation of
european patent specification

(11) NO/EP 2424889 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)
C12P 1/02 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2016.01.11
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2015.08.12
(86)	European Application Nr.	10719752.7
(86)	European Filing Date	2010.04.30
(87)	The European Application's Publication Date	2012.03.07
(30)	Priority	2009.04.30, US, 174184 P 2010.02.16, US, 304834 P
(84)	Designated Contracting States:	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 SE SI SK SM TR
(73)	Proprietor	Ablynx N.V., Technologiepark 21, 9052 Ghent-Zwijnaarde, BE-Belgia
(72)	Inventor	SCHOTTE, Peter, Hugo Verriestlaan 34, B-9840 De Pinte, BE-Belgia STANSSENS, Patrick, Ommegangstraat 5, B-9810 Nazareth, BE-Belgia LABEUR, Christine, Stijn Streuvelsstraat 28, B-8000 Brugge, BE-Belgia JONNIAUX, Jean-Luc, Vianderstraat 67, B-3300 Tienen, BE-Belgia LAUWEREYS, Marc Jozef, Wilgenstraat 2, 9450 Haaltert, BE-Belgia
(74)	Agent or Attorney	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54) Title **METHOD FOR THE PRODUCTION OF DOMAIN ANTIBODIES**

(56) References
Cited:

WO-A2-2006/047340
WO-A2-2006/058890
WO-A2-2006/138737
WO-A2-2008/142164
THOMASSEN Y E ET AL: "Specific production rate of VHH antibody fragments by Saccharomyces cerevisiae is correlated with growth rate, independent of nutrient limitation", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL LNKD- DOI:10.1016/J.JBIOTEC.2005.05.010, vol. 118, no. 3, 22 August 2005 (2005-08-22), pages 270-277, XP004987755, ISSN: 0168-1656
VAN DE LAAR TEUN ET AL: "Increased heterologous protein production by Saccharomyces cerevisiae growing on ethanol as sole carbon source.", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING 15 FEB 2007 LNKD- PUBMED:16948170, vol. 96, no. 3, 15 February 2007 (2007-02-15), pages 483-494, XP007914112, ISSN: 0006-3592
HARMSSEN M M ET AL: "Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments.", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY NOV 2007 LNKD- PUBMED:17704915, vol. 77, no. 1, November 2007 (2007-11), pages 13-22, XP019560673, ISSN: 0175-7598
CHADERJIAN WENDY B ET AL: "Effect of copper sulfate on performance of a serum-free CHO cell culture process and the level of free thiol in the recombinant antibody expressed",

BIOTECHNOLOGY PROGRESS, AMERICAN INSTITUTE OF CHEMICAL ENGINEERS, US LNKD- DOI:10.1021/BP0497029, vol. 21, no. 2, 1 March 2005 (2005-03-01), pages 550-553, XP009107034, ISSN: 8756-7938 cited in the application

BRIGITTE GASSER ET AL: "Antibody production with yeasts and filamentous fungi: on the road to large scale?", BIOTECHNOLOGY LETTERS, SPRINGER NETHERLANDS, vol. 29, no. 2, 22 November 2006 (2006-11-22), pages 201-212, XP019463949, ISSN: 1573-6776

BENJAMIN J HACKEL ET AL: "Production of Soluble and Active Transferrin Receptor-Targeting Single-Chain Antibody using *Saccharomyces cerevisiae*", PHARMACEUTICAL RESEARCH, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NL, vol. 23, no. 4, 25 March 2006 (2006-03-25) , pages 790-797, XP019405238, ISSN: 1573-904X, DOI: DOI:10.1007/S11095-006-9778-7

GASSER BRIGITTE ET AL: "Engineering of *Pichia pastoris* for improved production of antibody fragments", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, WILEY & SONS, HOBOKEN, NJ, US, vol. 94, no. 2, 1 June 2006 (2006-06-01), pages 353-361, XP002499994, ISSN: 0006-3592, DOI: DOI:10.1002/BIT.20851 cited in the application

SHUSTA E V ET AL: "Increasing the secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae* for production of single-chain antibody fragments", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 16, no. 8, 1 August 1998 (1998-08-01) , pages 773-777, XP002138520, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/NBT0898-773

RAHBARIZADEH F ET AL: "Over expression of anti-MUC1 single-domain antibody fragments in the yeast *Pichia pastoris*", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 43, no. 5, 1 February 2006 (2006-02-01), pages 426-435, XP027899229, ISSN: 0161-5890 [retrieved on 2006-02-01]

PAL BHUPINDER ET AL: "SCFCdc4-mediated degradation of the Hac1p transcription factor regulates the unfolded protein response in *Saccharomyces cerevisiae*", MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, vol. 18, no. 2, February 2007 (2007-02), pages 426-440, ISSN: 1059-1524

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. Fremgangsmåte for fremstilling, i en gjær, av et domene-antistoff som er i stand til å danne en enkelt antigenbindende enhet og som er **karakterisert ved** et redusert nivå eller fravær av en domene-antistoffvariant som mangler minst én disulfidbinding, omfattende

I) å anvende betingelser som fremmer dannelsen av disulfidbroer i domene-antistoffer, eller

II) å fjerne domene-antistoffer som mangler minst én disulfidbro ved å anvende betingelser valgt fra

i) bindende domene-antistoffer som omfatter frie tiolgrupper til egnede reaktive grupper, eventuelt under denaturerende betingelser; og

ii) reversfase-kromatografi med høy ytelse, eller

III) en kombinasjon av (I) og (II)

hvor de forhold som fremmer dannelsen av disulfidbroer er valgt fra én eller flere av de følgende:

a) tilsetning av oksidasjonsmidler, fortrinnsvis oksiderende metallioner, fortrinnsvis én eller flere valgt fra Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} og Zn^{2+} ;

b) å øke ekspresjon av en protein-disulfid-isomerase (PDI) med en egnet kontrollsekvens, eller ved å øke gendosen;

c) å tilpasse dyrkningsbetingelsene med én eller flere valgt fra de følgende: å senke dyrkningstemperaturen og/eller å optimalisere dyrkningsmediet, med én eller flere valgt fra følgende: reduksjon av metanoltilførsel for verter som krever en metanoltilførsel, senke ledeevnen til dyrkningsmediet, eller hvilken som helst kombinasjon derav;

d) refolding av domene-antistoffet i nærvær av redox-buffer, fortrinnsvis i ytterligere nærvær av denaturant;

e) å behandle domene-antistoffet ved oksygenering, økende temperatur, økende pH, eller høyt trykk, eller enhver kombinasjon derav; og

f) kombinasjoner av hvilke som helst av a) til e).

2. Fremgangsmåte for fremstilling, i en gjær, av et domene-antistoff som er i stand til å danne en enkelt antigen-bindende enhet, og som omfatter

I) å anvende betingelser som fremmer dannelsen av disulfidbroer i domene-antistoffer, eller

II) å fjerne domene-antistoffer som mangler minst én disulfidbro ved å anvende betingelser valgt fra

i) bindende domene-antistoffer som omfatter frie tiolgrupper til egnede reaktive grupper, eventuelt under denaturerende betingelser; og

ii) reversfase-kromatografi med høy ytelse, eller

III) en kombinasjon av (I) og (II)

hvor de forhold som fremmer dannelsen av disulfidbroer er valgt fra en eller flere av de følgende:

a) tilsetning av oksidasjonsmidler, fortrinnsvis oksiderende metallioner, fortrinnsvis én eller flere valgt fra Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} og Zn^{2+} til minst ett produksjonstrinn valgt fra: kulturmediet etter gjæring, hvor supernatanten omfatter domene-antistoffet etter fjerning av verten, alle trinn etter rensing av domene-antistoffet, eller det rensede domene-antistoffet;

eller

tilsetning av oksidasjonsmidler, fortrinnsvis oksiderende metallioner til en endelig konsentrasjon på 0,15 til 10 mM, fortrinnsvis én eller flere valgt fra Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} og Zn^{2+} ;

eller

tilsetningen av Cu^{2+} til en endelig konsentrasjon på 0,1 til 10 mM;

b) å øke ekspresjon av en protein-disulfid-isomerase (PDI) med en egnet kontroll-promoter, eller ved å øke gendosen;

c) å tilpasse dyrkningsbetingelsene med én eller flere valgt fra de følgende: å senke dyrkningstemperaturen til 25 °C, reduksjon av metanoltilførselen for *Pichia* til $\leq 5 \text{ ml/l} \cdot \text{h}$, senke ledeevnen til kulturmediet til $\leq 28 \text{ mS} \cdot \text{cm}$ eller enhver kombinasjon derav;

d) refolding av domene-antistoffet i nærvær av redox-buffer, fortrinnsvis i ytterligere nærvær av denaturant;

e) å behandle domene-antistoffet ved oksygenering, øke temperaturen til 40-60 °C, øke pH-verdien til 8-9, eller en hvilken som helst kombinasjon derav; og

f) kombinasjoner av hvilke som helst av a) til e).

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, hvor et oksidasjonsmiddel, fortrinnsvis oksiderende metallioner, mer foretrukket én eller flere valgt fra Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} og Zn^{2+} , tilsettes til minst ett produksjonstrinn av domene-antistoffet, fortrinnsvis valgt fra: dyrking av verten for å produsere domene-antistoffet, kultursupernatanten omfattende domene-antistoffet etter fjerning av verten, hvilket som helst trinn av rensing av domene-antistoffet, det rensede domene-antistoff.
4. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 3, hvor nevnte protein-disulfid-isomerase er valgt fra kalsekvestrin og andre PDI-beslektede proteiner som omfatter, men ikke er begrenset til, ERp72, ERp57, ERp60, ERp44, ERp5, ERp27 og PDIR.
5. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 4, hvor refolding av domene-antistoffet i nærvær av denaturant og redox-buffer utføres ved anvendelse av 2 M guanidiniumhydroklorid og 1 : 5 mM/mM cystamin/cysteamin.
6. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 5, hvor domene-antistoffet blir behandlet ved å øke temperaturen til 55 °C, øke pH-verdien til pH 8-9, eventuelt kombinert med oksygenering ved spyling med oksygen.
7. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 5, hvor domene-antistoffet er festet til en stasjonær fase av en kromatografisk kolonne.
8. Fremgangsmåte i henhold til kravene 1 til 7, hvor domene-antistoffet er en tungkjede-variabel domene-sekvens som er avledet fra et konvensjonelt fire-kjedet antistoff eller som består av en tungkjede-variabel domene-sekvens som er avledet fra et tungkjede-antistoff.
9. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 8, i det minste omfattende de trinn å dyrke verten for å produsere domene-antistoffet som omfatter:
 - a) dyrking av nevnte vert eller vertscelle under betingelser som er slik at verten eller vertscellen vil formere seg;
 - b) opprettholdelse av en vert eller vertscelle under betingelser som er slik at nevnte vert eller vertscelle uttrykker og/eller produserer domene-antistoffet; eventuelt etterfulgt av:

c) isolering og/eller rensing av det utskilte domene-antistoffet fra mediet.

5 **10.** Fremgangsmåte ifølge krav 9, hvor betingelser som fremmer dannelsen av disulfidbroer anvendes på ett eller flere av trinn a), trinn b) etter trinn b), eller på eller etter trinn c).

11. Fremgangsmåte ifølge krav 9, hvor betingelsene som fjerner domene-antistoffer som mangler minst én disulfidbro, tilføres etter trinn b).