



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2451839 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 16/00 (2006.01)
A61K 47/60 (2017.01)
A61K 47/65 (2017.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2020.09.21
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2020.04.22
(86)	European Application Nr.	10731480.9
(86)	European Filing Date	2010.07.09
(87)	The European Application's Publication Date	2012.05.16
(30)	Priority	2009.07.10, US, 270613 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 ; SE ; SI ; SK ; SM ; TR
(73)	Proprietor	Ablynx N.V., Technologiepark 21, 9052 Ghent-Zwijnaarde, Belgium
(72)	Inventor	STALS, Hilde, Raas van Gaverestraat 114, B-9000 Gent, Belgium DE BRABANDERE, Veronique, Skiweg 1, B-9000 Gent, Belgium SCHOTTE Peter, Hugo Vemestlaan 34, B-9840 De Pinte, Belgium
(74)	Agent or Attorney	TANDBERG INNOVATION AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Title	METHOD FOR THE PRODUCTION OF VARIABLE DOMAINS
(56)	References Cited:	WO-A2-2006/003388 WO-A2-2009/058383 WO-A2-2008/077945 SCHMIEDL^2 A ET AL: "Effects of unpaired cysteines on yield, solubility and activity of different recombinant antibody constructs expressed in E. coli", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METH, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 242, no. 1-2, 28 August 2000 (2000-08-28), pages 101-114, XP004210714, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/S0022-1759(00)00243-X 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] FIPULA ET AL: BIOMOL ENG, vol. 24, 2007, pages 201-215, MCCARTNEY J E ET AL: "ENGINEERING DISULFIDE-LINKED SINGLE-CHAIN FV DIMERS not (SFV)^2 3/4 WITH IMPROVED SOLUTION AND TARGETING PROPERTIES: ANTI-DIGOXIN 26-10(SFV)^2 AND ANTI-C-ERBB-2 741F8 (SFV)^2 MADE BY PROTEIN FOLDING

AND BONDED THROUGH C-TERMINAL CYSTEINYL PEPTIDES", PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 8, no. 3, 1 January 1994 (1994-01-01) , pages 301-314, XP000891223, ISSN: 0269-2139

SCHEPENS ET AL: J INFECT DIS, vol. 204, 2011, pages 1692-1701,

JAEHNICHEN ET AL: PNAS, vol. 107, 2010, pages 20565-20570,

MAUSSANG ET AL: J BIOL CHEM, vol. 288, 2013, pages 29562-29572,

YANG K ET AL: "Tailoring structure-function and pharmacokinetic properties of single-chain Fv proteins by site specific PEGylation" PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 16, no. 10, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 761-770, XP003015609 ISSN: 0269-2139

KALIBEROV ET AL: LAB INVEST, vol. 94, 2014, pages 893-905,

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 ekspresjonen og/eller fremstillingen av et polypeptid omfattende ett eller flere enkeltvariable immunglobulindomener og omfattende en C-terminal
5 forlengelse på maksimalt 10 aminosyrerester hvor minst én aminosyrerest er en cysteinrest, hvori det ene eller flere enkeltvariable immunglobulindomenene er festet til den C-terminale forlengelsen, fremgangsmåten omfattende trinnene:
a) å opprettholde en *Pichia pastoris*-vert under forhold som er slik at *Pichia pastoris*-verten uttrykker og/eller fremstiller polypeptidet;
10 b) å isolere og/eller rense det utskilte polypeptidet fra mediet;
hvori minst 80 % av polypeptidet isolert og/eller renset i trinn b) inneholder den minst ene cysteinresten i den C-terminale forlengelsen, som bestemt ved massespektrometri; og hvori den C-terminale forlengelsen velges fra et hvilket som helst av SEQ ID NO: 2–7.
- 2.** Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvori minst 90 % av polypeptidet isolert og/eller renset i trinn b) inneholder den minst ene cysteinresten i den C-terminale forlengelsen, som bestemt ved massespektrometri.
- 3.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 2, omfattende det
20 ytterligere trinnet å koble én eller flere grupper, rester eller deler til den minst ene cysteinresten til stede i den C-terminale forlengelsen.
- 4.** Fremgangsmåte ifølge krav 3, hvori den ene eller flere gruppene, restene eller delene velges fra polyetylenglykol (PEG), et peptid, et legemiddel med lite molekyl, et lipid og et
25 radiomerket molekyl.
- 5.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4, hvori det ene eller flere enkeltvariable immunglobulindomenene er en lettjedevariabel domenesekvens eller en tungjedevariabel domenesekvens som avledes fra et konvensjonelt firekjedet antistoff
30 eller en tungkjedevariabel domenesekvens som avledes fra et tungkjedet antistoff.
- 6.** Fremgangsmåte ifølge krav 5, hvori det ene eller flere enkeltvariable immunglobulindomenene er én eller flere VHH-sekvenser.
- 7.** *Pichia pastoris*-celle som omfatter en nukleinsyre eller genetisk konstruksjon som koder for et polypeptid omfattende ett eller flere enkeltvariable immunglobulindomener og omfattende en C-terminal forlengelse på maksimalt 10 aminosyrerester valgt fra et hvilket som helst av SEQ ID NO: 2–4 og 6–7, hvor minst én aminosyrerest er en

cysteinrest, hvori det ene eller flere enkeltvariable immunglobulindomenene er festet til den C-terminale forlengelsen, polypeptidet kan oppnås av en hvilken som helst av fremgangsmåtene ifølge kravene 1 til 6; og/eller som uttrykker, eller som under egnede omstendigheter er i stand til å uttrykke, et polypeptid omfattende ett eller flere enkeltvariable immunglobulindomener og omfattende en C-terminal forlengelse på maksimalt 10 aminosyrerester valgt fra et hvilket som helst av SEQ ID NO: 2-4 og 6-7, hvor minst én aminosyrerest er en cysteinrest, hvori det ene eller flere enkeltvariable immunglobulindomenene er festet til den C-terminale forlengelsen, polypeptidet kan oppnås ved en hvilken som helst av fremgangsmåtene ifølge kravene 1 til 6.