



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2523975 B1

NORWAY

(19) NO

(51) Int Cl.

C07K 16/24 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01)

C12N 9/48 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2019.11.18
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2019.07.17
(86)	European Application Nr.	11700144.6
(86)	European Filing Date	2011.01.13
(87)	The European Application's Publication Date	2012.11.21
(30)	Priority	2010.01.14, GB, 201000590
(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
(73)	Proprietor	UCB Biopharma SPRL, Allée de la Recherche 60, 1070 Brussels, Belgium
(72)	Inventor	ELLIS, Mark, c/o IPD UCB Celltech 208 Bath Road, Slough Berkshire SL1 3WE, Storbritannia HUMPHREYS, David Paul, c/o IPD UCB Celltech 208 Bath Road, Slough Berkshire SL1 3WE, Storbritannia
(74)	Agent or Attorney	TANDBERG INNOVATION AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Title	BACTERIAL HOST STRAIN COMPRISING A MUTANT SPR GENE AND A WILD-TYPE TSP GENE
(56)	References Cited:	WO-A2-02/061090, US-B1- 7 662 587, WO-A2-02/48376 ARAMINI JAMES M ET AL: "Solution NMR structure of the NlpC/P60 domain of lipoprotein Spr from Escherichia coli: Structural evidence for a novel cysteine peptidase catalytic triad", BIOCHEMISTRY, vol. 47, no. 37, September 2008 (2008-09), pages 9715-9717, XP002630320, ISSN: 0006-2960 cited in the application DATABASE UniProt [Online] 10 February 2009 (2009-02-10), "SubName: Full=Predicted peptidase, outer membrane lipoprotein;", XP002630316, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:B7UFJ2 Database accession no. B7UFJ2 TADOKORO AKIKO ET AL: "Interaction of the Escherichia coli lipoprotein NlpI with periplasmic Prc (Tsp) protease", JOURNAL OF BIOCHEMISTRY (TOKYO), vol. 135, no. 2, February 2004 (2004-02), pages 185-191, XP002630321, ISSN: 0021-924X HARA H ET AL: "OVERPRODUCTION OF PENICILLIN-BINDING PROTEIN 7 SUPPRESSES

THERMOSENSITIVE GROWTH DEFECT AT LOW OSMOLARITY DUE TO AN SPR MUTATION OF ESCHERICHIA COLI", MICROBIAL DRUG RESISTANCE, LIEBERT, US, vol. 2, no. 1, 1 January 1996 (1996-01-01) , pages 63-72, XP008015427, ISSN: 1076-6294 cited in the application

DATABASE UniProt [Online] 10 February 2009 (2009-02-10), "SubName: Full=Putative peptidase, outer membrane lipoprotein;", XP002630318, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:B7LJR7 Database accession no. B7LJR7

DATABASE UniProt [Online] 26 May 2009 (2009-05-26), "SubName: Full=Putative uncharacterized protein;", XP002630319, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:C1M6L5 Database accession no. C1M6L5

DATABASE UniProt [Online] 10 February 2009 (2009-02-10), "SubName: Full=Putative peptidase, outer membrane lipoprotein;", XP002630317, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:B7LAJ9 Database accession no. B7LAJ9

CHEN CHRISTINA ET AL: "High-level accumulation of a recombinant antibody fragment in the periplasm of Escherichia coli requires a triple-mutant (degP prc spr) host strain.", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 85, no. 5, 5 March 2004 (2004-03-05), pages 463-474, XP002630315, ISSN: 0006-3592 cited in the application

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 å fremstille et rekombinant protein av interesse som omfatter å dyrke en rekombinant gramnegativ bakteriecelle i et kulturmedium under forhold som er effektive for å uttrykke det rekombinante proteinet av interesse og utvinne det rekombinante proteinet av interesse fra periplasmaet til den rekombinante gram-negative bakteriecellen og/eller dyrkningsmediet, **karakterisert ved at** den rekombinante gramnegative bakteriecellen omfatter
- (a) et mutert *spr*-gen som koder for et mutert spr-protein som er i stand til å undertrykke fenotypen til en celle omfattende et mutert *Tsp*-gen, hvori det muterte *spr*-genet koder for et spr-protein som har en mutasjon ved aminosyre H145 i henhold til aminosyresekvensen til SEQ ID NO: 21, og
- (b) et ikke-rekombinant kromosomalt *Tsp*-gen av villtypen, hvori cellen er isogen til en *E. coli*-celle av villtypen bortsett fra det muterte *spr*-genet.
2. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori det muterte *spr*-genet koder for et spr-protein som har mutasjonen H145A, i samsvar med aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 21.
3. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 eller 2, hvori cellen videre omfatter et rekombinant polynukleotid som koder for DsbC.
4. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, hvori cellen videre omfatter ett av flere av de følgende muterte genene:
- a) et mutert DegP-gen som koder for et DegP-protein som har chaperonaktivitet og redusert proteaseaktivitet;
- b) et mutert ptr-gen, hvori det muterte ptr-genet koder for et Protease-III-protein som har redusert proteaseaktivitet eller er et knockout-mutert ptr-gen; og
- c. et mutert *OmpT*-gen, hvori det muterte *OmpT*-genet koder for et *OmpT*-protein som har redusert proteaseaktivitet eller er et knockoutmutert *OmpT*-gen.
5. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4, hvori cellen omfatter en vektor omfattende det rekombinante polynukleotidet som koder for DsbC og polynukleotidsekvensen som koder for et protein av interesse.
6. Fremgangsmåten ifølge krav 5, hvori vektoren omfatter en promotor som kontrollerer ekspresjonen av det rekombinante polynukleotidet som koder for DsbC og polynukleotidsekvensen som koder for et protein av interesse.

7. Fremgangsmåten ifølge krav 5 eller 6, hvori proteinet av interesse er et antistoff eller et antigenbindende fragment derav.

8. Fremgangsmåten ifølge krav 7, hvori antistoffet eller antigenbindingsfragmentet derav er spesifikt for TNF.

9. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 8, hvori det rekombinante proteinet av interesse utvinnes fra periplasmaet og/eller supernatanten.

10. Fremgangsmåten ifølge krav 9, som omfatter det ytterligere nedstrøms prosesseringstrinnet for PEGylering av proteinet av interesse.

11. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori *E. coli*-cellen er W3110.

12. Rekombinant gram-negativ bakteriecelle som omfatter:

(a) et mutert *spr*-gen som koder for et mutert spr-protein som er i stand til å undertrykke fenotypen til en celle omfattende et mutert *Tsp*-gen, hvori det muterte *spr*-genet koder for et spr-protein som har en mutasjon ved aminosyre H145 i henhold til aminosyresekvensen til SEQ ID NO: 21, og

(b) et ikke-rekombinant kromosomalt *Tsp*-gen av villtypen, hvori cellen er isogen til en *E. coli*-celle av villtypen bortsett fra det muterte *spr*-genet.

13. Rekombinant *E. coli* W3110-celle omfattende:

(a) et mutert *spr*-gen som koder for et mutert spr-protein som er i stand til å undertrykke fenotypen til en celle omfattende et mutert *Tsp*-gen, hvori det muterte *spr*-genet koder for et spr-protein som har en mutasjon ved aminosyre H145 i henhold til aminosyresekvensen til SEQ ID NO: 21, og

(b) et ikke-rekombinant kromosomalt *Tsp*-gen av villtypen,