



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2731973 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2018.04.23
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2017.11.15
(86)	European Application Nr.	12737492.4
(86)	European Filing Date	2012.07.13
(87)	The European Application's Publication Date	2014.05.21
(30)	Priority	2011.07.13, EP, 11173880
(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, BE-Belgia
(72)	Inventor	ELLIS, Mark, c/o IPDUCB Celltech208 Bath Road, SloughBerkshire SL1 3WE, GB- Storbritannia HUMPHREYS, David Paul, c/o IPDUCB Celltech208 Bath Road, SloughBerkshire SL1 3WE, GB-Storbritannia
(74)	Agent or Attorney	TANDBERG INNOVATION AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54) Title **BACTERIAL HOST STRAIN EXPRESSING RECOMBINANT DSBC**

(56) References
Cited: WO-A1-2011/086141, WO-A2-02/061090, WO-A2-2008/118356, JAMES M ARAMINI 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, AMERICAN
CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 47, no. 37, 1 September 2008 (2008-09-01), pages 9715-9717,
XP002630320, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/BI8010779 [retrieved on 2008-08-21], HU ET
AL: "Optimisation of production of a domoic acid-binding scFv antibody fragment in Escherichia
coli using molecular chaperones and functional immobilisation on a mesoporous silicate
support", PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO,
CA, vol. 52, no. 1, 8 January 2007 (2007-01-08), pages 194-201, XP005758623, ISSN: 1046-
5928, DOI: 10.1016/J.PEP.2006.08.009, MASKOS K ET AL: "DsbA and DsbC-catalyzed
Oxidative Folding of Proteins with Complex Disulfide Bridge Patterns In Vitro and In Vivo",
JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 325, no.
3, 17 January 2003 (2003-01-17), pages 495-513, XP027180830, ISSN: 0022-2836 [retrieved on
2003-01-17], HARA H ET AL: "OVERPRODUCTION OF PENICILLIN-BINDING PROTEIN 7
SUPPRESSES THERMOSENSITIVE GROWTH DEFECT AT LOW OSMOLARITY DUE TO AN

SPR MUATION 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, US-A1- 2006 204 493

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/>

5 Patentkrav

1. Rekombinant gram-negativ bakteriecelle, omfattende:
 - a) en ekspresjonsvektor omfattende et rekombinant polynukleotid som koder DsbC; og
 - 10 b) ett eller flere polynukleotider som koder et antistoff eller et antigen-bindende fragment derav som spesifikt binder til CD154;
 - c) et mutert Tsp-gen som koder et Tsp-protein som har 50% eller mindre av proteaseaktiviteten til et villtype umutert Tsp-protein som vist i SEKV. ID NR.: 26; og
 - d) et mutert spr-gen som koder et spr-protein hvis villtype-sekvens er vist i
 - 15 SEKV. ID NR.: 24, omfattende en mutasjon som påvirker aminosyren C94; og
 - hvor den gram-negative bakteriecellen er valgt fra E. coli-stammene K12 og W3110, og hvor bakteriecellen er isogen til nevnte stammer bortsett fra det rekombinante polynukleotidet som koder DsbC, det ene eller de flere polynukleotidene som koder et antistoff eller et antigen-bindende fragment derav som spesifikt binder til
 - 20 CD154, og det muterte Tsp-genet og det muterte spr-genet.
2. Gram-negativ bakteriecelle ifølge krav 1, hvor DsbC omfatter et histidin-merke ved N-terminus eller C-terminus.
- 25 3. Gram-negativ bakteriecelle ifølge krav 1 eller 2, hvor ekspresjonsvektoren omfatter et polynukleotid som har sekvensen gitt i SEKV. ID NR.:45 eller SEKV. ID NR.:51.
4. Gram-negativ bakteriecelle ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, hvor
- 30 antistoffet eller det antigen-bindende fragmentet derav omfatter en variabelt tungkjededomene omfattende tre CDR'er som har sekvensen gitt i SEKV. ID NR.: 1 for CDRH1, SEKV. ID NR.: 2, for CDRH2 og SEKV. ID NR.: 3 for CDRH3, og et

variabelt lettkjededomene omfattende tre CDR'er som har sekvensen gitt i SEKV. ID NR.: 4 for CDRL1, SEKV. ID NR.: 5 for CDRL2 og SEKV. ID NR.: 6 for CDRL3.

5. Gram-negativ bakteriecelle ifølge krav 4, hvor det ene eller de flere polynukleotidene koder et antistoff omfattende den variable lettkjedeområde-sekvensen gitt i SEKV. ID NR.:8 og det variable tungkjedeområdet gitt i SEKV. ID NR.:10.
6. Gram-negativ bakteriecelle ifølge ethvert av kravene 1 til 5, hvor antistoffet er et Fab- eller Fab'-fragment.
7. Gram-negativ bakteriecelle ifølge krav 6, hvor Fab- eller Fab'-fragmentet omfatter en lett kjede som har sekvensen gitt i SEKV. ID NR.:12 og en tung kjede som har sekvensen gitt i SEKV. ID NR.:14 eller 16.
8. Gram-negativ bakteriecelle ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, hvor den gram-negative bakteriecellen omfatter en første ekspresjonsvektor omfattende et rekombinant polynukleotid som koder DsbC, og en andre ekspresjonsvektor omfattende ett eller flere polynukleotider som koder et antistoff eller et antigen-bindende fragment derav som spesifikt binder til CD154.
9. Gram-negativ bakteriecelle ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, hvor ekspresjonsvektoren omfattende et rekombinant polynukleotid som koder DsbC i tillegg omfatter ett eller flere polynukleotider som koder et antistoff eller et antigen-bindende fragment derav som spesifikt binder til CD154.
10. Gram-negativ bakteriecelle ifølge ethvert foregående krav, hvor mutasjonen i spr-genet som koder et spr-protein resulterer i en endring av aminosyren cystein til alanin i posisjon 94 (C94A).

11. Gram-negativ bakteriecelle ifølge ethvert av kravene 1 til 10, som omfatter en ekspresjonsvektor omfattende et rekombinant polynukleotid som koder DsbC og en dicistronisk melding for å frembringe et antistoff eller antigen-bindende fragment derav som spesifikt binder til CD154, hvor oppstrøms-cistronet inneholder DNA som koder for antistoffets lette kjede og nedstrøms-cistronet inneholder DNA som koder for den tilsvarende tunge kjeden, karakterisert ved at den dicistroniske meldingen omfatter en sekvens valgt fra IGS1 (SEKV. ID NR.: 33), IGS2 (SEKV. ID NR.: 34), IGS3 (SEKV. ID NR.: 35) og IGS4 (SEKV. ID NR.: 36).
12. Fremgangsmåte for fremstilling av et antistoff eller et antigen-bindende fragment derav som spesifikt binder til CD154, omfattende å:
- a) dyrke en rekombinant gram-negativ bakteriecelle ifølge ethvert av kravene 1 til 11 i et dyrkingsmedium under betingelser i stand til å uttrykke antistoffet eller det antigen-bindende fragmentet derav som spesifikt binder til CD154 og det rekombinante polynukleotidet som koder DsbC; og
 - b) utvinne antistoffet eller et antigen-bindende fragment derav som spesifikt binder til CD154 fra periplasmaet til den rekombinante gram-negative bakteriecellen og/eller dyrkingsmediet.
13. Fremgangsmåte ifølge kravene 12, hvor fremgangsmåten videre omfatter et trinn med å tilknytte et effektormolekyl til en aminosyre ved eller mot C-terminalenden av den tunge kjeden og/eller den lette kjeden til antistoffet.
14. Fremgangsmåte ifølge krav 13, hvor effektormolekylet omfatter poly(etylenglykol) eller metoksypoly(etylenglykol).
15. Fremgangsmåte ifølge krav 14, hvor fremgangsmåten omfatter å tilknytte en lysyl-maleimid-gruppe til én av cysteinrestene ved C-terminalenden av den tunge kjeden, hvor hver aminogruppe i lysylresten har kovalent bundet til seg en metoksypoly(etylenglykol)rest med en molekylvekt på omtrent 20.000 Da.