



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2982690 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

(45)	Translation Published	2021.07.05
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2021.01.27
(86)	European Application Nr.	15174570.0
(86)	European Filing Date	2010.04.30
(87)	The European Application's Publication Date	2016.02.10
(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
(62)	Divided application	EP2424889, 2010.04.30
(73)	Proprietor	Ablynx N.V., Technologiepark 21, 9052 Ghent-Zwijnaarde, Belgia
(72)	Inventor	Schotte, Peter, Hugo Verriestlaan 34, 9840 De Pinte, Belgia Stanssens, Patrick, Ommegangstraat 5, 9810 Nazareth, Belgia Labeur, Christine, Stijn Streuvelsstraat 28, 8000 Brugge, Belgia Jonniaux, Jean-Luc, Vianderstraat 67, 3300 Tienen, Belgia Lauwereys, Marc, Wilgenstraat 2, 9450 Haaltert, Belgia
(74)	Agent or Attorney	TANDBERG INNOVATION AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

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

(56) References
Cited: WO-A2-2006/138737, WO-A2-2008/142164, WO-A2-2004/041863, WO-A2-2006/047340, TEUN VAN DE LAAR ET AL: "Increased Heterologous Protein Production by Saccharomyces cerevisiae Growing on Ethanol as Sole Carbon Source", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, WILEY & SONS, HOBOKEN, NJ, US, vol. 96, no. 3, 15 February 2007 (2007-02-15), pages 483-494, XP007914112, ISSN: 0006-3592 [retrieved on 2006-08-31]
YVONNE E THOMASSEN ET AL: "Large-scale production of VHH antibody fragments by Saccharomyces cerevisiae", ENZYME AND MICROBIAL TECHNO, STONEHAM, MA, US, vol. 30, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 273-278, XP007915755, ISSN: 0141-0229
BIRCH ET AL: "Antibody production", ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER,

AMSTERDAM, NL, vol. 58, no. 5-6, 7 August 2006 (2006-08-07), pages 671-685, XP005611421, ISSN: 0169-409X, DOI: 10.1016/J.ADDR.2005.12.006

"Pichia Fermentation Process Guidelines", INVITROGEN, 2002, pages 1-11,

HARMSSEN M M ET AL: "Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 77, no. 1, 18 August 2007 (2007-08-18), pages 13-22, XP019560673, ISSN: 1432-0614, DOI: 10.1007/S00253-007-1142-2

FIRER M A: "Efficient elution of functional proteins in affinity chromatography", JOURNAL OF BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL METHODS, AMSTERDAM, NL, vol. 49, no. 1-3, 30 October 2001 (2001-10-30), pages 433-442, XP002497544, ISSN: 0165-022X, DOI: 10.1016/S0165-022X(01)00211-1

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, vol. 118, no. 3, 22 August 2005 (2005-08-22), pages 270-277, XP004987755, ISSN: 0168-1656, DOI: 10.1016/J.JBIOTEC.2005.05.010

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: 10.1002/BIT.20851

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: 10.1007/S11095-006-9778-7

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

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, vol. 21, no. 2, 1 March 2005 (2005-03-01), pages 550-553, XP009107034, ISSN: 8756-7938, DOI: 10.1021/BP0497029

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 produsere et immunglobulins enkelt variable domene i en gjær, som omfatter

A) å anvende betingelser som fremmer dannelsen av disulfidbroer i immunglobulinets enkelt variable domenes, eller

B) å fjerne immunglobulinets enkelt variable domener som mangler minst én disulfidbro ved å anvende betingelser valgt fra

i) å binde immunglobulinets enkelt variable domener som omfatter frie tiol-grupper til immobiliserte tiol-grupper, eventuelt under denaturerende betingelser;

og

ii) revers-fase-høy-presisjons-kromatografi, eller

C) en kombinasjon av (A) og (B),

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

a) å tilsette oksiderende metallioner til minst ett produksjonstrinn valgt fra: kulturbuljongen etter fermentering, supernatanten som omfatter immunglobulinets enkelt variable domene etter fjerning av verten, hvilket som helst trinn etter rensing av immunglobulinets enkelt variable domene, eller det rensede immunglobulin enkelt variable domene eller

b) å tilsette Cu^{2+} til en endelig konsentrasjon på 1 til 10 mM.

2. Fremgangsmåten i henhold til krav 1 A) (a), hvor nevnte metallioner er valgt fra Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} and Zn^{2+} .

3. Fremgangsmåten i henhold til hvilket som helst av kravene 1 A) (a) eller 2, hvor nevnte metallioner blir tilsatt til en sluttkonsentrasjon av metallionet på 0,15 til 10 mM.

4. Fremgangsmåte i henhold til krav 1 A) (b), hvor Cu^{2+} blir tilsatt til en slutt-konsentrasjon på 1 til 10 mM til minst ett produksjonstrinn av immunglobulinets enkelt variable domene valgt fra:

å dyrke verten for å produsere immunglobulinets enkelt variable domene, kulturbuljongen etter fermentering, kultursupernatanten som omfatter immunglobulinets enkelt variable

domene etter fjerning av verten, hvilket som helst trinn etter rensing av immunoglobulinets enkelt variable domene, eller det rensede immunglobulinets enkelt variable domene.

5 **5.** Fremgangsmåten i henhold til et hvilket som helst av kravene 1 til 4, hvor nevnte tilsetning av oksiderende metallioner blir utført alene, eller i kombinasjon med én eller flere av betingelsene i henhold til krav 1 B).

10 **6.** Fremgangsmåten i henhold til et hvilket som helst av kravene 1 til 5, hvor immunglobulinets enkelt variable domene er festet til en stasjonær fase av en kromatografisk kolonne.

15 **7.** Fremgangsmåten i henhold til et hvilket som helst av kravene 1 til 6, hvor nevnte vert er valgt fra *Pichia*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Torulopsis*, *Torulaspora*, *Schizosaccharomyces*, *Citeromyces*, *Pachysolen*, *Debaromyces*, *Metschnikowia*, *Rhodospiridium*, *Leucosporidium*, *Botryoascus*, *Sporidiobolus*, *Endomycopsis*, fortrinnsvis *Pichia pastoris*.

20 **8.** Fremgangsmåte i henhold til et hvilket som helst av kravene 1 til 7, hvor immunglobulinets enkelt variable domene er en lett kjedes variable domene sekvens eller en tung kjedes variable domene sekvens.

25 **9.** Fremgangsmåte i henhold til krav 8, hvor immunglobulinets enkelt variable domene er en tung kjedes variable domene sekvens som er avledet fra et konvensjonelt firekjedet antistoff eller en tung kjedes variable domene sekvens som er avledet fra en tung kjedes antistoff.

30 **10.** Fremgangsmåten i henhold til et hvilket som helst av kravene 1 til 9, minst som omfatter trinnene med å dyrke verten for å produsere immunglobulinets enkelt variable domene som omfatter:

a) å dyrke nevnte vert eller vertscelle under betingelser som er slik at nevnte vert eller vertscelle vil formere seg;

35 b) å opprettholde en vert eller vertscelle under betingelser som er slik at nevnte vert eller vertscelle uttrykker og/eller produserer immunglobulinets enkelt variable domene;
eventuelt etterfulgt av:

c) å isolere og/eller å rense det utskilte immunglobulinets enkelt variable domene fra mediet.

11. Fremgangsmåten i henhold til krav 10, hvor betingelser som fremmer dannelsen av disulfidbroer blir anvendt etter trinn b), eller ved eller etter trinn c).

5 **12.** Fremgangsmåten i henhold til krav 10, hvor betingelser som fremmer dannelsen av disulfidbroer blir anvendt på det rene immunglobulinets enkelt variable domene, eller semi-rensede prøver, eller på materiale som er til stede i den uklarede kulturbuljong og/eller i klaret kulturmedium.

10 **13.** Fremgangsmåten i henhold til krav 10 hvor betingelser som fjerner immunglobulin enkelt variable domener som mangler minst én disulfidbro blir anvendt etter trinn b).