



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2993231 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 9/50 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2019.01.02
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2018.08.01
(86)	European Application Nr.	15182886.0
(86)	European Filing Date	2010.09.23
(87)	The European Application's Publication Date	2016.03.09
(30)	Priority	2009.09.24, GB, 0916821 2009.09.24, GB, 0916822
(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	UCB Biopharma SPRL, Allée de la Recherche 60, 1070 Brussels, Belgium
(72)	Inventor	Ellis, Mark, c/o IPD, UCB Celltech208 Bath Road, SloughBerkshire SL1 3WE, Storbritannia Humphreys, David Paul, IPD, UCB Celltech208 Bath Road, SloughBerkshire SL1 3WE, Storbritannia
(74)	Agent or Attorney	TANDBERG INNOVATION AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Title	BACTERIAL STRAIN FOR RECOMBINANT PROTEIN EXPRESSION, HAVING PROTEASE DEFICIENT DEGP RETAINING CHAPERONE ACTIVITY, AND KNOCKED OUT TSP AND PTR GENES
(56)	References Cited:	US-A- 5 264 365, BANEYX F ET AL: "Construction and characterization of Escherichia coli strains deficient in multiple secreted proteases: protease III degrades high-molecular-weight substrates in vivo", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC; US, vol. 173, no. 8, 1 January 1991 (1991-01-01), pages 2696-2703, XP008095286, ISSN: 0021-9193, SKORKO-GLONEK JOANNA ET AL: "The proteolytic activity of the HtrA (DegP) protein from Escherichia coli at low temperatures", MICROBIOLOGY (READING),, vol. 154, no. Part 12, 1 December 2008 (2008-12-01), pages 3649-3658, XP002607413,, WO-A2-02/48376, SPIESS C ET AL: "A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein", CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US LNKD- DOI:10.1016/S0092-8674(00)80743-6, vol. 97, no. 3, 30 April 1999 (1999-04-30) , pages 339-347, XP002266735, ISSN: 0092-8674, MEERMAN H J ET AL: "Construction and characterization of a set of E. coli strains deficient in all known loci

affecting the proteolytic stability of secreted recombinant proteins", BIO/TECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, US LNKD- DOI:10.1038/NBT1194-1107, vol. 12, 1 November 1994 (1994-11-01), pages 1107-1110, XP002969175, ISSN: 0733-222X

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

- 5 **1.** Rekombinant gram-negativ bakteriecelle som omfatter:
- a. et mutert Tsp-gen, hvori det muterte Tsp-genet koder for et Tsp-protein som har 50 % eller mindre av proteaseaktiviteten til en ikke-mutert Tsp av villtype eller er et knockoutmutert Tsp-gen;
- hvori cellen er isogen til en E. coli-celle W3110, bortsett fra det muterte Tsp-genet og
- 10 eventuelt en polynukleotidsekvens som koder for et protein av interesse.
- 2.** Celle ifølge krav 1, hvori det knockoutmuterte Tsp-genet omfatter en mutasjon til genstartkodonet og/eller ett eller flere stoppkodoner posisjonert nedstrøms for genstartkodonet og oppstrøms for genstoppkodonet.
- 15 **3.** Celle ifølge kravene 1 eller 2, hvori cellen omfatter et knockoutmutert Tsp-gen.
- 4.** Celle ifølge et hvilket som helst av krav 1 til 3, hvori cellen er stamme MXE001 avsatt ved National Collection of Type Cultures, HPA, UK med aksesjonsnummer NCTC13444.
- 20 **5.** Rekombinant gram-negativ bakteriecelle som omfatter:
- a. et mutert Tsp-gen, hvori det muterte Tsp-genet koder for et Tsp-protein som har 50 % eller mindre av proteaseaktiviteten til en ikke-mutert Tsp av villtype eller er et knockoutmutert Tsp-gen; og
- 25 b. et mutert DegP-gen som koder for et DegP-protein som har chaperonaktivitet, men ikke proteaseaktivitet,
- hvori cellen er isogen til en E. coli-celle W3110, bortsett fra de muterte Tsp- og DegP-genene og eventuelt en polynukleotidsekvens som koder for et protein av interesse.
- 30 **6.** Celle ifølge krav 5, hvori cellen er stamme MXE005 avsatt ved National Collection of Type Cultures, HPA, UK med aksesjonsnummer NCTC13448.
- 7.** Rekombinant gram-negativ bakteriecelle som omfatter:
- a. et mutert Tsp-gen, hvori det muterte Tsp-genet koder for et Tsp-protein som har
- 35 50 % eller mindre av proteaseaktiviteten til en ikke-mutert Tsp av villtype eller er et knockoutmutert Tsp-gen; og
- b. et knockout-mutert ptr-gen,

hvor cellen er isogen til en *E. coli*-celle W3110, bortsett fra de muterte Tsp- og ptr-genene og eventuelt en polynukleotidsekvens som koder for et protein av interesse.

5 **8.** Celle ifølge krav 7, hvor cellen er stamme MXE004 avsatt ved National Collection of Type Cultures, HPA, UK aksesjonsnummer NCTC13447.

9. Celle ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvor det muterte DegP-genet, det muterte ptr-genet og/eller det muterte Tsp-genet muteres for å omfatte ett eller flere restriksjonsmarkørsteder.

10

10. Celle ifølge krav 9, hvor det knockoutmuterte ptr-genet og/eller det knockoutmuterte Tsp-genet muteres for å omfatte et restriksjonsmarkørsted som omfatter et in-frame-stoppkodon.

15 **11.** Celle ifølge krav 9, hvor restriksjonsmarkørstedet er et *Ase I* -restriksjonssted.

12. Celle ifølge et hvilket som helst av krav 9 til 11, hvor det knockoutmuterte ptr-genet og/eller det knockoutmuterte Tsp-genet omfatter et restriksjonsmarkørsted opprettet av en missense-mutasjon til genstartkodonet og eventuelt en eller flere ytterligere punktmutasjoner.

20

13. Celle ifølge krav 12, hvor restriksjonsmarkørstedet er et *Eco I* -markørsted.

14. Celle ifølge et hvilket som helst av kravene 7 eller 9 til 13, hvor det knockoutmuterte ptr-genet omfatter SEQ ID NO:6.

25

15. Celle ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor det knockoutmuterte Tsp-genet omfatter SEQ ID NO:3.

16. Celle ifølge et hvilket som helst av kravene 5, 6 eller 9 til 15, hvor det muterte DegP-genet omfatter mutasjonen S210A.

30

17. Celle ifølge krav 16, hvor det muterte DegP-genet omfatter SEQ ID NO:9.

18. Celle ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvor cellen videre omfatter en polynukleotidsekvens som koder for et protein av interesse.

35

19. Celle ifølge krav 18, hvori polynukleotidsekvensen som koder for proteinet av interesse, er eksogen.

5 **20.** Celle ifølge krav 19, hvori cellen omfatter en ekspresjonskassett eller en vektor som omfatter polynukleotidsekvensen som koder for proteinet av interesse.

21. Celle ifølge et hvilket som helst av krav 18 til 20, hvori proteinet av interesse er et antistoff eller et antigenbindende fragment derav.

10 **22.** Celle ifølge krav 21, hvori antistoffet eller det antigenbindende fragmentet derav er spesifikt for TNF.

23. Fremgangsmåte for fremstilling av et rekombinant protein av interesse som omfatter
å uttrykke det rekombinante proteinet av interesse i en rekombinant gram-negativ
15 bakteriecelle som definert i et hvilket som helst av krav 1 til 22.