



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3279214 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2024.12.16
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2024.10.09
(86)	European Application Nr.	17192342.8
(86)	European Filing Date	2011.10.28
(87)	The European Application's Publication Date	2018.02.07
(30)	Priority	2010.10.29, US, 408228 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; RS; SE; SI; SK; SM; TR
(62)	Divided application	EP2632946, 2011.10.28
(73)	Proprietor	Ablynx NV, Technologiepark 21, 9052 Ghent-Zwijnaarde, Belgium
(72)	Inventor	Brigé, Ann, Biezenkouter 15, 9940 Ertvelde, Belgium Walcarius, Bart, Dwarsstraat 49, 9050 Gentbrugge, Belgium Meyvis, Yves, Rombaut Keldermansstraat 19, B-9000 Gent, Belgium Sergi, Mauro, Salurner Strasse 38c Top 1, 6330 Kufstein, Østerrike
(74)	Agent or Attorney	RWS, Europa House, Chiltern Park, Chiltern Hill, SL99FG CHALFONT ST PETER, Storbritannia

(54) Title **METHOD FOR THE PRODUCTION OF IMMUNOGLOBULIN SINGLE VARIABLE DOMAINS**

(56) References
Cited:

WO-A1-2006/030220, WO-A2-2008/142164,
ZOLODZ M D ET AL: "Separation by hydrophobic interaction chromatography and structural determination by mass spectrometry of mannosylated glycoforms of a recombinant transferrin-exendin-4 fusion protein from yeast", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1217, no. 2, 8 January 2010 (2010-01-08), pages 225 - 234, XP026817105, ISSN: 0021-9673, [retrieved on 20091030]
O. BOUÉ ET AL: "Production and biochemical characterization of the recombinant Boophilus microplus Bm95 antigen from Pichia pastoris", EXPERIMENTAL AND APPLIED ACAROLOGY, vol. 32, no. 1-2, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 119 - 128, XP055731099
CARNICER MARC ET AL: "Macromolecular and elemental composition analysis and extracellular metabolite balances of Pichia pastoris growing at different oxygen levels", MICROBIAL CELL FACTORIES, SPRINGER, vol. 8, no. 1, 9 December 2009 (2009-12-09), pages 65, XP021067674, ISSN: 1475-2859
M. M. HARMSSEN ET AL: "Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 77, no. 1, 18 August 2007 (2007-08-18), Berlin/Heidelberg, pages 13 - 22, XP055519503, ISSN: 0175-7598, DOI: 10.1007/s00253-007-1142-2
BEWLEY MARIA C ET AL: "X-ray crystallography and mass spectroscopy reveal that the N-lobe of human transferrin expressed in Pichia pastoris is folded correctly but is glycosylated on serine-32", BIOCHEMISTRY, vol. 38, no. 8, 23 February 1999 (1999-02-23), pages 2535 - 2541, XP002508535, ISSN: 0006-2960, [retrieved on 19990202], DOI: 10.1021/BI9824543

- STEINLEIN L M ET AL: "Production and purification of N-terminal half-transferrin in *Pichia pastoris*.", PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, vol. 6, October 1995 (1995-10-01), pages 619 - 624
- STEINLEIN L M ET AL: "Production and purification of N-terminal half-transferrin in *Pichia pastoris*.", PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION OCT 1995, vol. 6, no. 5, October 1995 (1995-10-01), pages 619 - 624, ISSN: 1046-5928
- J. AHN ET AL: "BiopharmaLynx: A new bioinformatics tool for automated LC/MS peptide mapping assignment", WATERS - THE SCIENCE OF WHAT IS POSSIBLE, 1 September 2008 (2008-09-01), pages 1 - 6, XP055731028, Retrieved from the Internet <URL:<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720002754en.pdf>> [retrieved on 20200916]
- ZHANG WENHUI ET AL: "Rational design and optimization of fed-batch and continuous fermentations.", METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (CLIFTON, N.J.) 2007, vol. 389, 2007, pages 43 - 64, ISSN: 1064-3745
- 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, XP025037145, ISSN: 0161-5890, [retrieved on 20060201], DOI: 10.1016/J.MOLIMM.2005.03.003
- RAHBARIZADEH F ET AL: "High expression and purification of the recombinant camelid anti-MUC1 single domain antibodies in *Escherichia coli*", PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, vol. 44, no. 1, 1 November 2005 (2005-11-01), pages 32 - 38, XP027390195, ISSN: 1046-5928, [retrieved on 20050930], DOI: 10.1016/J.PEP.2005.04.008
- ANONYMOUS: "EasySelect (TM) *Pichia* Expression Kit", 18 June 2010 (2010-06-18), pages I-VIII - 1-87, XP055015858, Retrieved from the Internet <URL:http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/easyselect_man.pdf> [retrieved on 20120106]
- ANONYMOUS: "*Pichia* Fermentation Process Guidelines", 30 May 2002 (2002-05-30), pages 1 - 11, XP055015860, Retrieved from the Internet <URL:http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pichiaferm_prot.pdf> [retrieved on 20120106]
- PINGZUO LI ET AL: "Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*", APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 142, 1 January 2007 (2007-01-01), New York, pages 105 - 124, XP055220800, ISSN: 0273-2289, DOI: 10.1007/s12010-007-0003-x
- ANONYMOUS: "The Gold Sheet", PHARMACEUTICAL & BIOTECHNOLOGY QUALITY CONTROL, vol. 38, no. 9, 1 September 2004 (2004-09-01), pages 1 - 32, XP055731017
- MIDDELHOVEN ET AL: "The pathway of arginine breakdown in *Saccharomyces cerevisiae*", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 93, no. 3, 9 December 1964 (1964-12-09), pages 650 - 652, XP025792842, ISSN: 0304-4165, [retrieved on 19641209], DOI: 10.1016/0304-4165(64)90349-6
- K. KITAMOTO ET AL: "Genetic Engineering of a Sake Yeast Producing No Urea by Successive Disruption of Arginase Gene", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 57, 1 January 1991 (1991-01-01), pages 301 - 306, XP055731032, DOI: 10.1128/AEM.57.1.301-306.1991
- "THE METABOLISM AND MOLECULAR PHYSIOLOGY OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, 2nd ed.", 1 January 2004, CRC PRESS, article J. RICHARD DICKINSON: "Chapter 4 - Nitrogen metabolism", pages: 104 - 113, XP055750936
- "BIOLOGY OF MICROORGANISMS ON GRAPES IN MUST AND IN WINE", 1 January 2009, article HELMUT KONIG ET AL: "BIOLOGY OF MICROORGANISMS ON GRAPES IN MUST AND IN WINE (PASSAGE)", pages: 175 - 177, XP055750943
- PAUL RAINVILLE ET AL: "Detecting Carbamylation of Intact Proteins and Peptides by LC/MS(/MS)", WATERS, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 1, XP055731108, Retrieved from the Internet <URL:<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/wa20706.pdf>> [retrieved on 20200916]
- BOERNER ET AL: "Defining Your Product Profile and Maintaining Control Over It Part 3", BIOPROCESS TECHNICAL, 1 October 2005 (2005-10-01), pages 51 - 56, XP055731022, Retrieved from the Internet <URL:<https://www.bioprocessintl.com/process-monitoring-and-controls/defining-your-product-profile-and-maintaining-control-over-it-part-3-product-related-impurities>> [retrieved on 20200916]

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 fremstilling av et variabelt immunglobulin-enkeltdomene i *Pichia pastoris*, som omfatter
 - 5 a) å anvende betingelser som reduserer karbamylering av én eller flere aminosyrerester i det variable immunglobulin-enkeltdomene, valgt blant:
 - å senke pH-en, i det minste i trinnet av å indusere verten til å fremstille det variable immunglobulin-enkeltdomene, til en pH på 6,45 eller mindre;
 - å senke induksjonstemperaturen fra 30°C til 27,5°C, 27°C, 26,5°C, 26°C, 25,5°C, 25°C,
 - 10 24,5°C, 24°C, 24,5°C, 23°C, 22°C eller 20°C;
 - å anvende en buffer uten urinstoff under rensing,
 - og
 - b) å fjerne det variable immunglobulin-enkeltdomene som omfatter én eller flere karbamylerte aminosyrerester.
- 15 2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor karbamylering reduseres i trinnet av å dyrke verten.
3. Fremgangsmåte ifølge krav 2, hvor karbamylering reduseres i trinnet av å indusere verten for å fremstille det variable immunglobulin-enkeltdomene.
- 20 4. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, hvor karbamylering reduseres i dyrkningsbuljongen etter fermentering.
- 25 5. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4, hvor karbamylering reduseres i supernatanten som omfatter det variable immunglobulin-enkeltdomene etter fjerning av verten.
6. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5, hvor karbamylering reduseres i et hvilket som helst trinn av rensning av det variable immunglobulin-enkeltdomene.
- 30 7. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 6, hvor karbamylering reduseres i trinnet av det rensede variable immunglobulin-enkeltdomene.
- 35 8. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor det variable immunglobulin-enkeltdomene som omfatter én eller flere karbamylerte aminosyrerester, fjernes ved hjelp av én eller flere kromatografiteknikker.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 8, hvor kromatografiteknikkene er kromatografiteknikker som er basert på forskyvninger i pI eller hydrofobisitet, mest foretrukket ionebytterkromatografi.

5

10. Fremgangsmåte ifølge kravene 1 til 9, hvor det variable immunglobulin-enkeltdomene er et VHH, er et variabelt immunglobulin-enkeltdomene avledet fra et kamel-tungkjedeantistoff som har blitt humanisert, eller er et variabelt immunglobulin-enkeltdomene som er avledet fra et humant immunglobulin som har blitt kamelisert.

10

11. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10, som i det minste omfatter trinnene av å dyrke verten eller vertscellen for å fremstille det variable immunglobulin-enkeltdomene som omfatter:

15 i) å dyrke verten eller vertscellen under betingelser som er slik at verten eller vertscellen mangfoldiggjøres;

ii) å holde verten eller vertscellen under betingelser som er slik at verten eller vertscellen uttrykker og/eller fremstiller det variable immunglobulin-enkeltdomene;

iii) valgfritt etterfulgt av isolering og/eller rensing av det sekreterte variable immunglobulin-enkeltdomene fra mediet.

20

12. Fremgangsmåte ifølge krav 11, hvor betingelsene som reduserer karbamylering av én eller flere aminosyrerester i det variable immunglobulin-enkeltdomene, anvendes på ett eller flere av trinn i), trinn ii), etter trinn ii) eller på eller etter trinn iii), fortrinnsvis ved trinn ii).