



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3597659 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 1/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45) Translation Published 2023.05.15

(80) Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent 2023.03.01

(86) European Application Nr. 19181777.4

(86) European Filing Date 2008.07.08

(87) The European Application's Publication Date 2020.01.22

(30) Priority 2007.07.09, US, 94867707 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 ; MT ; NL ; NO ; PL ; PT ; RO ; SE ; SI ; SK ; TR

(62) Divided application EP3327026, 2008.07.08

(73) Proprietor Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, USA

(72) Inventor KAO, Yunh-hsiang, 760 Pico Avenue, San Mateo, CA 94403, USA
SCHMIDT, Melody Trexher, 30 Northview Court, Danville, CA 94506, USA
LAIRD, Michael W., 244 Silk Hill Ct., San Ramon, CA 94582, USA
WONG, Rita L., 15 West Summit Drive, Redwood City, CA 94062, USA
HEWITT, Daniel P., 715 Conrado Terrace Unit 1, Sunnyvale, CA 94085, USA

(74) Agent or Attorney ZACCO NORWAY AS, Postboks 488, 0213 OSLO, Norge

(54) Title **PREVENTION OF DISULFIDE BOND REDUCTION DURING RECOMBINANT PRODUCTION OF POLYPEPTIDES**

(56) References Cited: US-A1- 2006 142 549
WO-A-97/26357
US-A1- 2004 138 424
NORDBERG J ET AL: "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system.", FREE RADICAL BIOLOGY & MEDICINE 1 DEC 2001, vol. 31, no. 11, 1 December 2001 (2001-12-01), pages 1287-1312, XP002519388, ISSN: 0891-5849
ZHANG WEI ET AL: "Free sulfhydryl in recombinant monoclonal antibodies", BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol. 18, no. 3, May 2002 (2002-05), pages 509-513, XP002500112, ISSN: 8756-7938
KAO YUNG-HSIANG ET AL: "Mechanism of Antibody Reduction in Cell Culture Production Processes", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 107, no. 4, November 2010 (2010-11), pages 622-632, XP002694207,
D.J. ROUSH ET AL: "Advances in Primary Recovery: Centrifugation and Membrane Technology", BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol. 24, no. 3, 15 April 2008 (2008-04-15) , pages 488-495, XP55090116, ISSN: 8756-7938, DOI: 10.1021/bp070414x

- KERBLAT I ET AL: "Importance of thioredoxin in the proteolysis of an immunoglobulin G as antigen by lysosomal Cys-proteases", IMMUNOLOGY, vol. 97, no. 1, May 1999 (1999-05), pages 62-68, XP002519384, ISSN: 0019-2805
- TEILUM K ET AL: "Disulfide Bond Formation and Folding of Plant Peroxidases Expressed as Inclusion Body Protein in Escherichia coli Thioredoxin Reductase Negative Strains", PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, vol. 15, no. 1, 1 February 1999 (1999-02-01), pages 77-82, XP004441744, ISSN: 1046-5928
- POWIS G ET AL: "Properties and biological activities of thioredoxins", ANNUAL REVIEW OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY 2001 US, vol. 41, 2001, pages 261-295, XP002519387, ISSN: 0362-1642
- URIG S ET AL: "On the potential of thioredoxin reductase inhibitors for cancer therapy", SEMINARS IN CANCER BIOLOGY, SAUNDERS SCIENTIFIC PUBLICATIONS, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 16, no. 6, 1 December 2006 (2006-12-01), pages 452-465, XP024908082, ISSN: 1044-579X [retrieved on 2006-12-01]
- TREXLER-SCHMIDT M ET AL: "Identification and prevention of antibody disulfide bond reduction during cell culture manufacturing", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING 20100615 JOHN WILEY AND SONS INC. USA, vol. 106, no. 3, 15 June 2010 (2010-06-15), pages 452-461, XP002694206, DOI: 10.1002/BIT.22699
- LYDERSEN B K ET AL: "Acid precipitation of mammalian cell fermentation broth", ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 745, 30 November 1994 (1994-11-30), pages 222-231, XP009033271, ISSN: 0077-8923, DOI: 10.1111/J.1749-6632.1994.TB44375.X
- POWIS G ET AL: "Thioredoxin redox control of cell growth and death and the effects of inhibitors", CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS 19980424 IE, vol. 111-112, 24 April 1998 (1998-04-24), pages 23-34, XP002519386, ISSN: 0009-2797
- BOBOVNIKOVA Y ET AL: "Characterization of soluble, disulfide bond-stabilized, prokaryotically depressed human thyrotropin receptor ectodomain", ENDOCRINOLOGY, vol. 138, no. 2, 1997, pages 588-593, XP002519385, ISSN: 0013-7227
- GROMER STEPHAN ET AL: "The thioredoxin system: From science to clinic.", MEDICINAL RESEARCH REVIEWS, vol. 24, no. 1, January 2004 (2004-01), pages 40-89, XP002694209, ISSN: 0198-6325
- 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, vol. 21, no. 2, March 2005 (2005-03), pages 550-553, XP002500111, ISSN: 8756-7938

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/>

EP3597659

1

Patentkrav

- 5 **1.** Fremgangsmåte for å forhindre reduksjonen av en disulfidbinding i et antistoff uttrykt i en rekombinant vertscelle under behandling etter fermentering, omfattende, etter fermentering, gjennomblåsing av pre-høstingen eller høstet cellekulturfluid til den rekombinante vertscellen med luft, hvori den rekombinante vertscellen er en rekombinant vertscelle av kinesisk hamsterovarie (CHO) og hvori antistoffet uttrykt i den rekombinante vertscellen er et terapeutisk monoklonalt antistoff.
- 10
- 2.** Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori fremgangsmåten omfatter å gjennomblåse pre-høstercellekulturfluidet med luft.
- 3.** Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori fremgangsmåten omfatter å
- 15 gjennomblåse det høstede cellekulturfluidet med luft.
- 4.** Fremgangsmåten ifølge krav 3, hvori luftgjennomblåsing fortsettes inntil det høstede cellekulturfluidet er minst 30 % mettet med luft.
- 20 **5.** Fremgangsmåten ifølge krav 3 eller 4, hvori luftgjennomblåsing fortsettes inntil det høstede cellekulturfluidet er mellom 100 % mettet til 30 % mettet med luft.
- 6.** Fremgangsmåten ifølge krav 3, hvori mengden av oppløst oksygen (dO_2) i det
- 25 høstede cellekulturfluidet er minst 10 %.
- 7.** Fremgangsmåten ifølge krav 3, hvori mengden av oppløst oksygen (dO_2) i det høstede cellekulturfluidet er minst 30 %.
- 30 **8.** Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–7, hvori antistoffet uttrykt i den rekombinante vertscellen er et terapeutisk monoklonalt antistoff som binder seg til VEGF.

EP3597659

2

9. Fremgangsmåten ifølge krav 8, hvori antistoffet som binder seg til VEGF omfatter:

(a) et lettkjedevariabelt domene (V_L) ifølge SEQ ID NO: 20 og et tungkjedevariabelt domene (V_H) ifølge SEQ ID NO: 21;

5 (b) et lettkjedevariabelt domene (V_L) ifølge SEQ ID NO: 22 og et tungkjedevariabelt domene (V_H) ifølge SEQ ID NO: 23; eller

(c) et lettkjedevariabelt domene (V_L) ifølge SEQ ID NO: 24 og et tungkjedevariabelt domene (V_H) ifølge SEQ ID NO: 25.

10 **10.** Fremgangsmåten ifølge krav 9, hvori antistoffet som binder seg til VEGF omfatter et lettkjedevariabelt domene (V_L) ifølge SEQ ID NO: 22 og et tungkjedevariabelt domene (V_H) ifølge SEQ ID NO: 23.

15 **11.** Fremgangsmåten ifølge krav 8, hvori antistoffet som binder seg til VEGF er bevacizumab.

12. Fremgangsmåten ifølge krav 9, hvori antistoffet som binder seg til VEGF omfatter et lettkjedevariabelt domene (V_L) ifølge SEQ ID NO: 24 og et tungkjedevariabelt domene (V_H) ifølge SEQ ID NO: 25.

20

13. Fremgangsmåten ifølge krav 1–12, hvori antistoffet uttrykt i den rekombinante vertscellen fremstilles i en skala på mer enn 5000 L.

25 **14.** Fremgangsmåten ifølge krav 1–13, videre omfattende trinnet med å utvinne antistoffet fra det høstede cellekulturfluidet.

15. Fremgangsmåten ifølge krav 1–13, videre omfattende trinnet med å rense antistoffet fra det høstede cellekulturfluidet.