



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3877552 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12R 1/19 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2023.06.05
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2023.02.22
(86)	European Application Nr.	19836059.6
(86)	European Filing Date	2019.11.07
(87)	The European Application's Publication Date	2021.09.15
(30)	Priority	2018.11.08, US, 201862757498 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
(73)	Proprietor	Sutro Biopharma, Inc., 111 Oyster Point Blvd, South San Francisco, CA 94080, USA
(72)	Inventor	GROFF, Daniel, c/o SUTRO BIOPHARMA, INC. 310 Utah Street Suite 150, South San Francisco, California 94080, USA
(74)	Agent or Attorney	Nordic Patent Service A/S, Bredgade 30, 1260 KØBENHAVN K, Danmark

(54) Title **E COLI STRAINS HAVING AN OXIDATIVE CYTOPLASM**

(56) References
Cited:

WO-A1-2011/100362

JULIE LOBSTEIN ET AL: "SHuffle, a novel Escherichia coli protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm", MICROBIAL CELL FACTORIES,, vol. 11, no. 1, 8 May 2012 (2012-05-08), pages 1-16, XP021129014, ISSN: 1475-2859, DOI: 10.1186/1475-2859-11-56

KAUR JASHANDEEP ET AL: "Strategies for optimization of heterologous protein expression in E. coli: Roadblocks and reinforcements", INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, vol. 106, 19 August 2017 (2017-08-19), pages 803-822, XP085267625, ISSN: 0141-8130, DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2017.08.080

MICHAEL-PAUL ROBINSON ET AL: "Efficient expression of full-length antibodies in the cytoplasm of engineered bacteria", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 6, 27 August 2015 (2015-08-27), page 8072, XP055389534, DOI: 10.1038/ncomms9072

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. *E. coli*-stamme, hvori:

i) stammen mangler aktiviteten til en tioredoksinreduktase som følge av genetisk modifikasjon av *trxB*;

ii) stammen mangler aktiviteten til et tioredoksin 1 som følge av genetisk modifikasjon av *trxA*;

iii) stammen mangler aktiviteten til en glutathionreduktase som følge av genetisk modifikasjon av *gor*;

iv) stammen uttrykker et mutert AhpC-protein, hvori det muterte AhpC-proteinet har glutathionreduktaseaktivitet, men mangler peroksyreduktaseaktivitet; og

v) stammen uttrykker en cytosolisk prokaryotisk disulfidisomerase.

2. *E. coli*-stammen ifølge krav 1, hvori

a) stammen videre omfatter et gen som koder for et protein av interesse,

b) den cytosoliske disulfidisomerasen er DsbC,

c) *E. coli* uttrykker videre en rekombinant prolylisomerase og/eller en deaggregase,

d) ekspresjonen av det muterte AhpC-proteinet kontrolleres av en Pc0-promotor,

e) ekspresjonen av den cytosoliske prokaryote disulfidisomerasen kontrolleres av en MTL-promotor, eller

f) *E. coli*-stammen er en K-12-stamme.

3. *E. coli*-stammen ifølge krav 2 a), hvori proteinet av interesse er valgt fra gruppen som består av: et antistoff, et fragment derav eller en antistofflekkjede fra et IgG.

4. *E. coli*-stammen ifølge krav 2 a), hvori genet som koder for proteinet av interesse er operativt koblet til en induserbar promotor,

5. *E. coli*-stammen ifølge krav 4, hvori den induserbare promotoren er en T7-promotor.

6. *E. coli*-stammen ifølge krav 2 c), hvori

prolylisomerasen er valgt fra gruppen som består av syklofilin, FKBP-er, parvulin, SlyD, Tig, yCpr6; og

deaggregasen er valgt fra gruppen som består av Skp, GroEL, GroES, DnaK, DnaJ og GrpE.

7. Fremgangsmåte for å uttrykke løselige, rekombinante proteiner av interesse i *E. coli*-bakteriestammer omfattende trinnet:

å dyrke en *E. coli*-bakteriestamme omfattende et oksiderende cytosol og en ekspresjonskasset for å uttrykke et protein av interesse under forhold som tillater ekspresjon av proteinet av interesse som et løselig protein, hvori stammen:

i) mangler tioredoksinreduktaseaktivitet som følge av genetisk modifikasjon av *trxB*;

ii) mangler tioredoksin-1-aktivitet som følge av genetisk modifikasjon av *trxA*;

iii) mangler aktiviteten til en glutathionreduktase som følge av genetisk modifikasjon av *gor*;

iv) uttrykker et *ahpC*-gen som er blitt mutert slik at et enzym uttrykt fra *ahpC*-genet har glutathionreduktaseaktivitet, men mangler peroksyreduktaseaktivitet; og

v) uttrykker et gen som koder for en cytosolisk prokaryotisk disulfidisomerase.

8. Fremgangsmåten ifølge krav 7, hvori

a) *E. coli*-stammen inneholder en nullmutasjon i *trxC*, *trxB* eller *trxA*,

b) proteinet av interesse er valgt fra gruppen som består av: et IgG, en lett kjede fra et IgG eller en tungkjede fra et IgG,

c) cytosolisk disulfidisomerase er DsbC eller gjærproteindisulfidisomerase (yPDI),

d) *E. coli*-stammen uttrykker videre en rekombinant prolylisomerase og/eller en rekombinant deaggregase,

e) genet som koder for proteinet av interesse er operativt koblet til en induserbar promotor, fortrinnsvis en T7-promotor,

f) *E. coli*-stammen uttrykker et GshA-protein kodet av *gshA*-genet, eller

g) *E. coli*-stammen uttrykker videre en T7-polymerase.

9. Fremgangsmåten ifølge krav 8 d), hvori

den rekombinante prolylisomerasen er valgt fra gruppen som består av syklofilin, FKBP-er, parvulin, SlyD, Tig og yCpr6; og

deaggregasen er valgt fra gruppen som består av Skp, GroEL, GroES, DnaK, DnaJ og GrpE.

10. Fremgangsmåten ifølge krav 8 b), hvori lettkjeden til antistoffet er en lettkjede av et anti-HER2-antistoff.
- 5 11. Fremgangsmåten ifølge krav 8 f), hvori *gshA*-genet settes inn i lokuset til *TrxB*.
12. Fremgangsmåten ifølge krav 8 g), hvori T7-polymerasen er under kontroll av en induserbar promotor.
- 10 13. Fremgangsmåten ifølge krav 11, hvori den induserbare promotoren er en P_{araBAD}, lac, lacUV5 phoA, tetA, xylAB, tac eller rhamnosepromotor.
14. Sett omfattende *E. coli* ifølge et hvilket som helst av kravene 1–6, hvori settet videre omfatter et vekstmedium.
- 15 15. Sett ifølge krav 14, hvori settet videre omfatter et plasmid som koder for et protein av interesse.