



(19) REPUBLIKA HRVATSKA  
DRŽAVNI ZAVOD ZA  
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO

(10) Identifikator  
dokumenta:

HR P20192217 T1



HR P20192217 T1

(12) **PRIJEVOD PATENTNIH ZAHTJEVA  
EUROPSKOG PATENTA**

(51) MKP:

**C12N 9/02** (2006.01)  
**C12N 9/90** (2006.01)  
**C07K 1/16** (2006.01)  
**C07K 1/18** (2006.01)  
**C07K 1/20** (2006.01)  
**C07K 1/113** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)

(46) Datum objave prijevoda patentnih zahtjeva: 21.02.2020.

(21) Broj predmeta: P20192217T

(22) Datum podnošenja zahtjeva u HR: 10.12.2019.

(86) Broj međunarodne prijave: PCT/US2016021059  
Datum podnošenja međunarodne prijave: 04.03.2016.

(96) Broj europske prijave patenta: EP 16712126.8  
Datum podnošenja europske prijave patenta: 04.03.2016.

(87) Broj međunarodne objave: WO 2016144824  
Datum međunarodne objave: 15.09.2016.

(97) Broj objave europske prijave patenta: EP 3265557 A1  
Datum objave europske prijave patenta: 10.01.2018.

(97) Broj objave europskog patenta: EP 3265557 B1  
Datum objave europskog patenta: 16.10.2019.

(31) Broj prve prijave: 201562129701 P

(32) Datum podnošenja prve prijave: 06.03.2015.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US

(73) Nositelj patenta:

(72) Izumitelji:

**F. Hoffmann - La Roche AG, Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, CH**  
**Marc Wong, c/o Genentech Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, CA**  
**94080, US**  
**Liliana T. Yee, c/o Genentech Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, CA**  
**94080, US**  
**Amy Lim, c/o Genentech Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, CA**  
**94080, US**  
**Chris B. Fong, c/o Genentech Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, CA**  
**94080, US**

(74) Zastupnik:

CPZ - CENTAR ZA PATENTE d.o.o., 10000 Zagreb, HR

(54) Naziv izuma:

**ULTRA-PROČIŠĆENI DsbA I DsbC TE POSTUPCI NJIHOVE IZRADE I UPORABE**

HR P20192217 T1

## PATENTNI ZAHTEJEVI

1. Postupak za pročišćavanje disulfid oksidoreduktaze A (DsbA) polipeptida iz staničnog lizata koji sadrži DsbA polipeptid, **naznačen time, da** postupak uključuje
  - a) dodavanje polietilenimina (PEI) u konačnu koncentraciju od 0,01% do 1,0%, po mogućnosti 0,1%, u stanični lizat koji sadrži DsbA polipeptid,
  - b) pročišćavanje staničnog lizata centrifugiranjem,
  - c) nanošenje pročišćenog staničnog lizata koji sadrži DsbA polipeptid na materijal za kromatografiju anionskom izmjenom,
  - d) eluiranje DsbA polipeptida iz materijala za kromatografiju anionskom izmjenom kako bi se stvorio eluat anionske izmjene koji sadrži polipeptid DsbA,
  - e) nanošenje eluata anionske izmjene koji sadrži DsbA polipeptid na materijal za kromatografiju kationskom izmjenom,
  - f) eluiranje DsbA polipeptida iz materijala za kromatografiju kationskom izmjenom, kako bi se dobio eluat kationske izmjene koji sadrži pročišćeni DsbA, pri čemu DsbA sadrži najmanje 95% monomernog DsbA polipeptida.
2. Postupak prema patentnom zahtjevu 1, **naznačen time, da** izbistreni lizat sadrži 10 mM MOPS (3-(N-morfolino)propan sulfonska kiselina), s pH 7,1.
3. Postupak prema bilo kojem patentnom zahtjevu 1 ili 2, **naznačen time, da** je materijal za kromatografiju anionskom izmjenom jedan snažni anionski izmjenjivač, poželjno kvarterni amin, još poželjnije kvarterni amin povezan s umreženom agarozom.
4. Postupak prema bilo kojem patentnom zahtjevu od 1 do 3, **naznačen time, da** postupak uključuje jedan ili više od sljedećih koraka:
  - i) DsbA se eluira iz materijala za kromatografiju anionskom izmjenom sa sljedećim fazama:
    - 15% od 25 mM Tris i 250 mM NaCl pri pH 9,2 za četiri volumena stupca,
    - 20% od 25 mM Tris i 250 mM NaCl pri pH 9,2 za četiri volumena stupca,
    - 25% od 25 mM Tris i 250 mM NaCl pri pH 9,2 dok DsbA ne eluira iz stupca,
  - ii) izbistreni lizat koji sadrži DsbA polipeptid iz koraka b) propušta se kroz 0,22 µm filter prije kromatografije anionskom izmjenom,
  - iii) izbistreni lizat koji sadrži DsbA polipeptid iz koraka b) prilagođava se na pH 9,0 prije kromatografije anionskom izmjenom,
  - iv) eluat anionske izmjene sakuplja se u frakcijama,
  - v) frakcije anionske izmjene koje sadrže najmanje 55% DsbA, odabrane su za daljnje pročišćavanje,
  - vi) eluat anionske izmjene iz koraka d) prilagođava se na pH 5,0 prije kromatografije kationskom izmjenom,
  - vii) materijal za kromatografiju kationskom izmjenom iz koraka e) ispire se s pet volumena stupca od 12,5 mM MES prije eluiranja,
  - viii) DsbA se eluira iz materijala za kromatografiju kationskom izmjenom iz koraka e) koristeći gradijent soli od 0% do 60% od 12,5 mM MES i jednog M NaCl preko 15 volumena stupca,
  - ix) eluat kationske izmjene sakuplja se u frakcijama, ili
  - x) prikupljaju se frakcije kationske izmjene, koje čine barem 95% DsbA.
5. Postupak prema patentnom zahtjevu 4, **naznačen time, da** se frakcije eluata anionske izmjene iz koraka iv) analiziraju kromatografijom isključenja na osnovi veličine čestica prije kromatografije kationskom izmjenom.
6. Postupak prema patentnim zahtjevima 4 ili 5, **naznačen time, da** se frakcije eluata kationske izmjene iz koraka ix) analiziraju kromatografijom isključenja na osnovi veličine čestica.
7. Postupak prema bilo kojem patentnom zahtjevu od 1 do 6, **naznačen, time, da** materijal za kationsku izmjenu sadrži sulfopropilni dio.
8. Postupak prema patentnom zahtjevu 7, **naznačen time, da** je sulfopropilni dio povezan s matricom umreženog poli(stiren-divinilbenzena) ili s njegovim ekvivalentima.
9. Postupak prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 1 do 8, **naznačen time, da** je DsbA polipeptid *Escherichia coli* DsbA polipeptid.
10. Postupak prema patentnom zahtjevu 9, **naznačen time, da** DsbA polipeptid sadrži aminokiselinsku sekvencu IDENTIFIKACIJSKOG BR. SEKVENCE: 1, ili barem 80% identičnu aminokiselinskoj sekvenci IDENTIFIKACIJSKOG BR. SEKVENCE: 1.
11. Postupak prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 1 do 10, **naznačen time, da** se DsbA eksprimira u stanici *E. coli*.
12. Postupak prema patentnom zahtjevu 11, **naznačen time, da** se DsbA eksprimira u stanici *E. coli* koja je modificirana inženjeringom tako, da eksprimira DsbA na višim razinama od endogene ekspresije DsbA.
13. Postupak za pročišćavanje protutijela koja specifično vežu DsbA, **naznačen time, da** obuhvaća dovođenje u doticaj pripravka koji sadrži anti-DsbA protutijela s kromatografskim materijalom koji sadrži DsbA, pri čemu DsbA sadrži najmanje 95% monomernog DsbA polipeptida, pričvršćenog na potporni materijal, ispiranje kromatografskog materijala radi uklanjanja nevezanih spojeva i eluiranje anti-DsbA protutijela, pri čemu se DsbA proizvodi postupkom prema bilo kojem patentnom zahtjevu od 1 do 12.
14. Postupak prema patentnom zahtjevu 13, **naznačen time, da** manje od 1% protutijela specifično veže spojeve koji

nisu DsbA.

15. Postupak za kvantificiranje DsbA u uzorku, **naznačen time, da** uključuje otkrivanje DsbA u uzorku pomoću sustava detekcije i uspoređivanje količine DsbA otkrivenog u uzorku s otkrivanjem jedne ili više koncentracija DsbA referentnog standarda, pri čemu referentni standard DsbA sadrži najmanje 95% monomernog DsbA polipeptida.
16. Postupak prema patentnom zahtjevu 15, **naznačen time, da** je DsbA referentni standard proizveden prema postupku iz bilo kojeg patentnog zahtjeva od 1 do 12.
17. Postupak prema patentnom zahtjevu 15 ili 16, **naznačen time, da** je sustav za otkrivanje jedan imunološki test.
18. Postupak prema patentnom zahtjevu 17, **naznačen time, da** imunološki test sadrži protutijela koja se specifično vežu na DsbA, pri čemu DsbA sadrži najmanje 95% monomernog DsbA polipeptida.
19. Postupak za analizu rekombinantnog uzorka polipeptida na prisutnost i/ili količine DsbA, **naznačen time, da** uključuje otkrivanje DsbA u uzorku pomoću uporabe imunološkog testa i usporedbu količine DsbA otkrivenog u uzorku s otkrivanjem jedne ili više koncentracija DsbA referentnog standarda, pri čemu referentni standard DsbA sadrži najmanje 95% monomernog DsbA polipeptida.
20. Postupak prema patentnom zahtjevu 19, **naznačen time, da** se referentni standard DsbA proizvodi prema bilo kojem patentnom zahtjevu od 1 do 12, pri čemu referentni standard DsbA sadrži najmanje 95% monomernog DsbA polipeptida.
21. Postupak prema patentnim zahtjevima 19 ili 20, **naznačen time, da** imunološki test obuhvaća protutijela koja se specifično vežu za DsbA, pri čemu DsbA sadrži najmanje 95% monomernog DsbA polipeptida.
22. Postupak prema patentnom zahtjevu 21, **naznačen time, da** su protutijela koja se specifično vežu na DsbA, pri čemu DsbA sadrži najmanje 95% monomernog DsbA polipeptida, poliklonska protutijela, gdje se protutijela upotrebljavaju kao protutijela za hvatanje u imunološkom testu i/ili kao protutijela za otkrivanje.
23. Postupak prema patentnom zahtjevu 21 ili 22, **naznačen time, da** se protutijela koja specifično vežu DsbA, proizvode u skladu s postupkom prema patentnom zahtjevu 13 ili 14.
24. Postupak prema bilo kojem patentnom zahtjevu od 19 do 23, **naznačen time, da** se rekombinantni polipeptid proizvodi u stanici domaćina.
25. Postupak prema patentnom zahtjevu 24, **naznačen time, da** je stanica domaćina stanica *E.coli*.
26. Postupak prema patentnom zahtjevu 25, **naznačen time, da** stanica *E.coli* prekomjerno eksprimira DsbA.
27. Postupak prema patentnom zahtjevu 19, **naznačen time, da** je uzorak konačni pročišćeni proizvod rekombinantnog polipeptida.
28. Postupak prema patentnom zahtjevu 27, **naznačen time, da** je konačni pročišćeni proizvod rekombinantnog polipeptida protutijelo ili imunoadhezin.
29. Imunološki test za otkrivanje DsbA u uzorku, pri čemu se uzorak dobiva iz rekombinantnog polipeptidnog pripravka ili stanične linije domaćina, **naznačen time, da** postupak uključuje:
  - (a) dovođenje u doticaj protutijela za hvatanje koje veže DsbA s uzorkom, stvarajući tako kombinirani materijal protutijela za hvatanje uzorka;
  - (b) dovođenje u doticaj detekcijskog protutijela koje veže DsbA s kombinacijskim materijalom protutijela za hvatanje uzorka; i
  - (c) otkrivanje protutijela za otkrivanje vezanog za kombinacijski materijal protutijela za hvatanje uzorka; i
  - (d) određivanje količine DsbA prisutnog u uzorku usporedbom standardne krivulje titracije sa standardnom titracijskom krivuljom koja je generirana s DsbA pripravkom, pri čemu DsbA pripravak sadrži najmanje 95% monomernog DsbA polipeptida.
30. Test kvalitete za farmaceutski pripravak koji sadrži rekombinantni polipeptid proizveden iz bakterijske stanice, **naznačen time, da** test oslobađanja obuhvaća podvrgavanje uzorka farmaceutskog pripravka imunološkom testu prema postupku iz patentnog zahtjeva 29, pri čemu količina DsbA otkrivena u pripravku, određuje da li je farmaceutski pripravak pogodan za primjenu na životinji.
31. Test kvalitete iz patentnog zahtjeva 30, **naznačen time, da** količina DsbA u farmaceutskom pripravku koja je manja od oko 1 ppm, ukazuje na to, da je farmaceutski pripravak pogodan za primjenu na životinji.
32. Imunološki test iz patentnog zahtjeva 29, ili test kvalitete iz patentnog zahtjeva 30, **naznačen time, da** je bakterijska stanica *E.coli* stanica.
33. Imunološki test iz patentnog zahtjeva 32, **naznačen time, da** stanica *E.coli* prekomjerno eksprimira DsbA.
34. Imunološki test ili test kvalitete iz patentnog zahtjeva 32 ili 33, **naznačen time, da** je uzorak stanični lizat.
35. Imunološki test ili test kvalitete iz patentnih zahtjeva od 32 do 34, **naznačen time, da** je rekombinantni polipeptidni pripravak konačni pročišćeni proizvod.
36. Imunološki test ili test kvalitete prema bilo kojem patentnom zahtjevu od 32 do 34, **naznačen time, da** je rekombinantni polipeptid koji je u sadržaju rekombinantnog polipeptidnog pripravka, protutijelo ili imunoadhezin.
37. Imunološki test od testa kvalitete iz patentnog zahtjeva 36, **naznačen time, da** je protutijelo multispecifično protutijelo, bispecifično protutijelo, polu-protutijelo ili fragment protutijela.
38. Komplet za otkrivanje DsbA u farmaceutskom pripravku, **naznačen time, da** sadrži rekombinantni polipeptid, proizveden iz bakterijske stanice, pri čemu navedeni komplet sadrži pripravak anti-DsbA protutijela iz zahtjeva 13 ili 14 i pripravak koji sadrži DsbA za upotrebu kao referentni standard, gdje DsbA sadrži najmanje 95% monomernog DsbA, te služi u generiranju standardnih krivulja za kvantitativno određivanje DsbA u uzorku i/ili za

upotrebu kao pozitivna provjera, pri čemu je pripravak koji sadrži DsbA proizveden prema postupcima iz bilo kojeg patentnog zahtjeva od 1 do 12.