



(12) Translation of new
European patent specification
After opposition procedure

(11) NO/EP 2486048 B2

NORWAY (19) NO
(51) Int Cl.

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2017.04.03
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2016.11.23
(45)	Decision of the opposition in EPO	2019.12.25
	Decision of the opposition in NIPO	2020.04.27
(86)	European Application Nr.	10765714.0
(86)	European Filing Date	2010.10.06
(87)	The European Application's Publication Date	2012.08.15
(30)	Priority	2009.10.06, US, 278343 P 2010.10.05, US, 897857
(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	Bristol-Myers Squibb Company, Route 206 and Province Line Road, Princeton, NJ 08543, USA
(72)	Inventor	JING, Ying, 25 Maurice Road, Wellesley, MA 02482, USA LI, Zhengjian, c/o Bristol-Myers Squibb Company 6000 Thompson Road Building 22A 1st Floor, Syracuse, NY 13057, USA QIAN, Yueming, c/o Bristol-Myers Squibb Company 6000 Thompson Road Building 22A 1st Floor, Syracuse, NY 13057, USA
(74)	Agent or Attorney	TANDBERG INNOVATION AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Title	METHODS OF PRODUCTION OF GLYCOPROTEINS IN MAMMALIAN CELL CULTURES USING GLUCOCORTICIDS
(56)	References Cited:	WO-A2-01/05956 AU-A1- 2004 201 287 JING YING ET AL: "Sialylation Enhancement of CTLA4-Ig Fusion Protein in Chinese Hamster Ovary Cells by Dexamethasone", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 107, no. 3, October 2010 (2010-10), pages 488-496, XP002623483, LIPSCOMB M L ET AL: "Production of a secreted glycoprotein from an inducible promoter system in a perfusion bioreactor", BIOTECHNOLOGY PROGRESS SEPTEMBER/OCTOBER 2004 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY US, vol. 20, no. 5, September 2004 (2004-09), pages

1402-1407, XP002623481,

LINSLEY P S ET AL: "IMMUNOSUPPRESSION IN VIVO BY A SOLUBLE FORM OF THE CTLA-4 T CELL ACTIVATION MOLECULE", SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, WASHINGTON, DC; US, vol. 257, no. 5071, 7 August 1992 (1992-08-07), pages 792-795, XP002021688, ISSN: 0036-8075, DOI: DOI:10.1126/SCIENCE.1496399

BORK K ET AL: "Increasing the sialylation of therapeutic glycoproteins: the potential of the sialic acid biosynthetic pathway", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION, WASHINGTON, US, vol. 98, no. 10, 1 October 2009 (2009-10-01), pages 3499-3508, XP002572996, ISSN: 0022-3549, DOI: DOI:10.1002/JPS.21684 [retrieved on 2009-02-06]

QIAN YUEMING ET AL: "Glucocorticoid Receptor-Mediated Reduction of IgG-Fusion Protein Aggregation in Chinese Hamster Ovary Cells", BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol. 26, no. 5, September 2010 (2010-09), pages 1417-1423, XP002623482,

COUGHLAN C M ET AL: "The biochemical consequences of alpha2,6(N) sialyltransferase induction by dexamethasone on sialoglycoprotein expression in the rat H411e hepatoma cell line", FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 413, no. 2, 18 August 1997 (1997-08-18), pages 389-393, XP004261294, ISSN: 0014-5793, DOI: DOI:10.1016/S0014-5793(97)00923-X

XIA M ET AL: "Dexamethasone enhances CTLA-4 expression during T cell activation", CMLS CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES, vol. 55, no. 12, September 1999 (1999-09), pages 1649-1656, XP002623479, ISSN: 1420-682X

VANDAMME VALERIE ET AL: "Transcriptional induction of beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase in rat fibroblast by dexamethasone", EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 211, no. 1-2, 1993, pages 135-140, XP002623480, ISSN: 0014-2956

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. Cellekulturprosess for fremstilling av et løselig CTLA4-molekyl, omfattende: a) dyrking av CHO-celler som fremstiller et løselig CTLA4-molekyl i cellekultur under forhold som tillater proteinfremstilling; og b) tilsetning av ikke-toksiske nivåer av glukokortikoid.
2. Cellekulturprosessen ifølge krav 1, hvori sialylering av det løselige CTLA4-molekylet økes sammenlignet med sialylering i en kultur uten glukokortikoidtilsetning.
3. Cellekulturprosessen ifølge krav 1, hvori cellenes levedyktighet økes sammenlignet med cellenes levedyktighet i en kultur uten glukokortikoidtilsetning.
4. Cellekulturprosessen ifølge krav 1, hvori CTLA4-titer økes sammenlignet med CTLA4-titer i en kultur uten glukokortikoidtilsetning.
5. Cellekulturprosessen ifølge krav 1, hvori CTLA4-molekylaggregering reduseres sammenlignet med CTLA4-molekylaggregering i en kultur uten glukokortikoidtilsetning.
6. Cellekulturprosessen ifølge kravene 1-5, hvori glukokortikoidet velges fra gruppen som består av deksametason, betametason, fludrokortisonacetat, hydrokortison, metylprednisolon, prednisolon, prednison og triamcinolon.
7. Cellekulturprosessen ifølge kravene 1-5, hvori glukokortikoidnivået opprettholdes i cellekulturen i en konsentrasjon på 1 nM til 1 mM.
8. Cellekulturprosessen ifølge kravene 1-5, hvori glukokortikoidet tilsettes til basalmediet, tilførselsmediet eller som en bolus når som helst under kulturprosessen.
9. Prosessen ifølge kravene 1-5, hvori glukokortikoidet tilsettes en gang etter inokulering som er før begynnelsen av den første dødsfasen.
10. Prosessen ifølge krav 9, hvori glukokortikoidet tilsettes en gang etter inokulering som er under den innledende vekstfasen.
11. Prosessen ifølge krav 10, hvori glukokortikoidet tilsettes på eller rundt slutten av den innledende vekstfasen.

12. Cellekulturprosessen ifølge et hvilket som helst av kravene 1-11, hvori det løselige CTLA4-molekylet er et løselig CTLA4-mutant molekul som omfatter aminosyresekvensen som begynner med metionin i posisjon +1 eller alanin i posisjon -1 og slutter ved asparaginsyre i posisjon 124 som vist i fig. 20 forbundet med en immunglobulindel omfattende hengsel-, CH2- og CH3-domener, hvori glukokortikoidet er deksametason og deksametason vedvares eller opprettholdes i cellekulturen i en konsentrasjon på 0,1 μ M til 10 μ M, og hvori cellekulturvolumet er minst 500 liter.

13. Cellekulturprosessen ifølge krav 12, hvori det løselige CTLA4-molekylet er et løselig CTLA4-mutant molekul som omfatter aminosyresekvensen som begynner med metionin i posisjon +1 eller alanin i posisjon -1 og slutter ved asparaginsyre i posisjon 124 som vist i fig. 20 forbundet med en immunglobulindel omfattende hengsel-, CH2- og CH3-domener, hvori cellene tilføres med et tilførselsmedium omfattende glukokortikoiddeksametason, og hvori cellekulturvolumet er minst 500 liter.

14. Cellekulturprosessen ifølge et hvilket som helst av kravene 1-11, hvori det løselige CTLA4-molekylet omfatter aminosyresekvensen som begynner med metionin i posisjon +1 eller alanin i posisjon -1 og slutter ved asparaginsyre i posisjon 124 som vist i fig. 19 forbundet med en immunglobulindel omfattende hengsel-, CH2- og CH3-domener, hvori glukokortikoidet er deksametason og deksametason vedvares eller opprettholdes i cellekulturen i en konsentrasjon på 0,1 nM til 0,1 μ M, og hvori cellekulturvolumet er minst 500 liter.

15. Cellekulturprosessen ifølge et hvilket som helst av kravene 1-11, hvori det løselige CTLA4-molekylet omfatter aminosyresekvensen som begynner med metionin i posisjon +1 eller alanin i posisjon -1 og slutter ved asparaginsyre i posisjon 124 som vist i fig. 19 forbundet med en immunglobulindel omfattende hengsel-, CH2- og CH3-domener, hvori cellene tilføres med et tilførselsmedium omfattende glukokortikoiddeksametasonet, hvori cellekulturvolumet er minst 500 liter.

16. Cellekulturprosessen ifølge et hvilket som helst av kravene 1-11, 14 og 15, hvori det løselige CTLA4-molekylet omfatter en aminosyresekvens som begynner med metionin i posisjon +1 eller alanin i posisjon -1 og slutter ved lysin i posisjon +357 som vist i fig. 19.

17. Cellekulturprosessen ifølge et hvilket som helst av kravene 1-11, 12 og 13, hvori det løselige CTLA4-mutante molekylet omfatter en aminosyresekvens som begynner med metionin i posisjon +1 eller alanin i posisjon -1 og slutter ved lysin i posisjon +357 som

vist i fig. 20.

18. Cellekulturprosessen ifølge krav 8, hvori glukokortikoidet er deksametason og deksametason tilsettes til tilførselsmediet.