



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2592148 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/69 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2019.01.21
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2018.09.12
(86)	European Application Nr.	12191535.9
(86)	European Filing Date	2008.10.09
(87)	The European Application's Publication Date	2013.05.15
(30)	Priority	2007.10.12, EP, 07019999
(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
(73)	Proprietor	F. Hoffmann-La Roche AG, Grenzacher Strasse 124, 4070 Basel, Sveits
(72)	Inventor	Goepfert, Ulrich, c/o Roche Diagnostics GmbHNonnenwald 2, 82377 Penzberg, Tyskland Knoetgen, Hendrik, c/o Roche Diagnostics GmbHNonnenwald 2, 82377 Penzberg, Tyskland Kopetzki, Erhard, c/o Roche Diagnostics GmbHNonnenwald 2, 82377 Penzberg, Tyskland Stern, Anne, c/o Roche Diagnostics GmbHNonnenwald 2, 82377 Penzberg, Tyskland
(74)	Agent or Attorney	PLOUGMANN VINGTOFT, Postboks 1003 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Title	Protein expression from multiple nucleic acids
(56)	References Cited:	WO-A-93/01296, WO-A-95/17513, WO-A-94/25067, US-A1- 2003 096 341, MORETTO NADIA ET AL: "Conformation-sensitive antibodies against Alzheimer amyloid-beta by immunization with a thioredoxin-constrained B-cell epitope peptide", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,; US, vol. 282, no. 15, 1 April 2007 (2007-04-01), pages 11436-11445, XP002451806, ISSN: 0021-9258, WO-A-99/47647, WO-A-2007/113172, US-A- 5 852 175, WO-A-89/10959

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 rekombinant produksjon av et heterologt immunoglobulin i en CHO-celle utskilt til dyrkingsmediet, som omfatter:

a) å tilveiebringe en CHO-celle, som er

- tilpasset til vekst i suspensjonskultur,
- tilpasset til vekst i serumfritt medium,
- mykoplasmafritt;

b) å tilveiebringe en nukleinsyre som omfatter

- et prokaryot replikasjonsorigo,
- en første nukleinsyresekvens som gir resistens mot et prokaryot seleksjonsmiddel,
- en andre nukleinsyresekvens som koder for den tunge kjeden til det heterologe immunoglobulinet, og/eller
- en tredje nukleinsyresekvens som koder for den lette kjeden til det heterologe immunoglobulinet,

slik at det tilveiebringes en første transfeksjonsvektor som omfatter den tilveiebrakte nukleinsyren og i tillegg en fjerde nukleinsyresekvens som gir resistens mot et første eukaryot seleksjonsmiddel,

slik at det tilveiebringes en andre transfeksjonsvektor som omfatter den tilveiebrakte nukleinsyren og i tillegg en fjerde nukleinsyresekvens som gir resistens mot et andre eukaryot seleksjonsmiddel, idet det andre eukaryote seleksjonsmidlet er forskjellig fra det første eukaryote seleksjonsmidlet,

b1) å tilveiebringe en nukleinsyre som omfatter

- et prokaryot replikasjonsorigo,
- en første nukleinsyresekvens som gir resistens mot et prokaryot seleksjonsmiddel,
- en andre nukleinsyresekvens som koder for den tunge kjeden til det heterologe immunoglobulinet, og/eller en tredje nukleinsyresekvens som koder for den lette kjeden til det heterologe immunoglobulinet,

slik at det tilveiebringes en tredje transfeksjonsvektor som omfatter den tilveiebrakte nukleinsyren og i tillegg en fjerde nukleinsyresekvens som gir resistens mot et tredje eukaryot seleksjonsmiddel, idet det tredje eukaryote seleksjonsmidlet er forskjellig fra det første eukaryote seleksjonsmidlet og også er forskjellig fra det andre eukaryote seleksjonsmidlet,

c) å transfektere CHO-cellen, idet transfeksjonen omfatter de følgende trinnene i følgende rekkefølge:

(i) å transfektere CHO-cellen med den første transfeksjonsvektoren,

(ii) å velge en CHO-celle transfektert i (i) ved selektiv dyrking i dyrkningsmedium som inneholder et første eukaryot seleksjonsmiddel som den første transfeksjonsvektoren gir resistens mot,

(iii) å transfektere den valgte CHO-cellen i (ii) med den andre transfeksjonsvektoren,

(iv) å velge en CHO-celle transfektert i (iii) ved selektiv dyrking i dyrkningsmedium som inneholder det første eukaryote seleksjonsmidlet som den første transfeksjonsvektoren gir resistens mot, og det andre eukaryote seleksjonsmidlet som den andre transfeksjonsvektoren gir resistens mot,

(v) å transfektere den valgte CHO-cellen i (iv) med den tredje transfeksjonsvektoren,

(vi) å velge en CHO-celle transfektert i (v) ved selektiv dyrking i dyrkningsmedium som inneholder det første eukaryote seleksjonsmidlet som den første transfeksjonsvektoren gir resistens mot, og det andre eukaryote seleksjonsmidlet som den andre transfeksjonsvektoren gir resistens mot, og det tredje eukaryote seleksjonsmidlet som den tredje transfeksjonsvektoren gir resistens mot,

d) å dyrke den transfekterte CHO-cellen i et medium i nærvær av det første og det andre og det tredje eukaryote seleksjonsmidlet, under forhold egnet for ekspresjon av den første, andre og/eller tredje nukleinsyren,

e) å utvinne det utskilte heterologe immunoglobulinet fra dyrkningsmediet og derved frembringe et heterologt immunoglobulin i en CHO-celle som er utskilt til dyrkningsmediet,

idet den første, andre og tredje transfeksjonsvektoren skiller seg fra hverandre bare den i nukleinsyren som gir resistens mot det første, andre og tredje eukaryote seleksjonsmidlet.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at CHO-cellen er en CHO K1-celle, eller en CHO DG44-celle, eller en CHO XL99-celle, eller en CHO DXB11-celle, eller en CHO DP12-celle.

3. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, karakterisert ved at den andre og/eller tredje nukleinsyren inneholder hybrid intron nukleinsyresekvens.

4. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, karakterisert ved at promotoren som benyttes til transkripsjonen av den andre og den tredje nukleinsyren er forskjellig fra promotoren som benyttes for transkripsjonen av den fjerde nukleinsyren.

5. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, karakterisert ved at promotoren som benyttes til transkripsjonen av den andre og den tredje nukleinsyren er den samme.

6. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, karakterisert ved at valget av en CHO-celle transfektert i trinn c) (i) og/eller (iii) gjøres ved dyrking i dyrkningsmedium uten et seleksjonsmiddel i 12 til 72 timer og deretter selektiv dyrking i dyrkningsmedium som inneholder det første seleksjonsmidlet i tilfelle (ii) eller det første og andre eukaryote seleksjonsmidlet i tilfelle (iv).

7. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, karakterisert ved at kodon-bruken i den andre og tredje nukleinsyren optimaliseres for translasjon i CHO-celler.

8. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, karakterisert ved at trinn c) og trinn d) utføres i det samme mediet.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 8, karakterisert ved at mediet er et serumfritt medium eller et serumfritt medium supplert med definerte animalske komponenter eller et medium fritt for animalske komponenter eller et proteinfritt medium, et proteinfritt medium supplert med definerte animalske komponenter, eller et definert proteinfritt medium, eller et kjemisk definert medium.
10. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, karakterisert ved at i trinn d) foregår dyrkingen i nærvær av de eukaryote seleksjonsmidlene i et volum på mindre enn 500 liter og at dyrkingen foregår i fravær av de eukaryote seleksjonsmidlene i et volum på 500 liter eller mer, og at det utskilte heterologe immunoglobulinet utvinnes fra dyrkningsmediet uten de eukaryote seleksjonsmidlene.
11. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, karakterisert ved at produktiviteten til CHO-cellene over 40 generasjoner ikke er mindre enn 70 % og ikke mer enn 130 % av produktiviteten etter 10 generasjoner av dyrking som delt batch-dyrking.
12. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, karakterisert ved at produktiviteten til CHO-cellene over 60 generasjoner ikke er mindre enn 50 % og ikke mer enn 150 % av produktiviteten etter 10 generasjoner av dyrking som delt batch-dyrking.
13. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, karakterisert ved at produktiviteten til CHO-cellene er minst 1,5 g/l av det heterologe immunoglobulinet innen 21 dager som matet batch-dyrking.
14. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, karakterisert ved at fremgangsmåten videre omfatter:
f) å rense det heterologe immunoglobulinet med ett eller flere kromatografiske trinn.
15. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, karakterisert ved at den transfekterte CHO-cellen i trinn d) har
- en doblingstid på 150 % eller mindre av doblingstiden for CHO-cellen som velges i undertrinn (ii),

- et volumetrisk utbytte på minst 125 % sammenlignet med det volumetriske utbyttet av CHO-cellen som velges i (ii).

16. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, karakterisert ved at det heterologe immunoglobulinet er et antistoff mot A β .

17. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, karakterisert ved at det heterologe immunoglobulinet er et antistoff mot P-selektin.

18. CHO-celle som kan fås med følgende fremgangsmåte:

a) tilveiebringe en CHO-celle, som er

- tilpasset til vekst i suspensjonskultur,
- tilpasset til vekst i serumfritt medium,
- mykoplasmafritt;

b) tilveiebringe en nukleinsyre som omfatter

- et prokaryot replikasjonsorigo,
- en første nukleinsyresekvens som gir resistens mot et prokaryot seleksjonsmiddel,
- en andre nukleinsyresekvens som koder for den tunge kjeden til det heterologe immunoglobulinet, og/eller en tredje nukleinsyresekvens som koder for den lette kjeden til det heterologe immunoglobulinet,

slik at det tilveiebringes en første transfeksjonsvektor som omfatter den tilveiebrakte nukleinsyren og i tillegg en fjerde nukleinsyresekvens som gir resistens mot et første eukaryot seleksjonsmiddel,

slik at det tilveiebringes en andre transfeksjonsvektor som omfatter den tilveiebrakte nukleinsyren og i tillegg en fjerde nukleinsyresekvens som gir resistens mot et andre eukaryot seleksjonsmiddel, idet det andre eukaryote seleksjonsmidlet er forskjellig fra det første eukaryote seleksjonsmidlet,

b1) tilveiebringe en nukleinsyre som omfatter

- et prokaryot replikasjonsorigo,

- en første nukleinsyresekvens som gir resistens mot et prokaryot seleksjonsmiddel,
 - en andre nukleinsyresekvens som koder for den tunge kjeden til det heterologe immunoglobulinet, og/eller en tredje nukleinsyresekvens som koder for den lette kjeden til det heterologe immunoglobulinet,
- slik at det tilveiebringes en tredje transfeksjonsvektor som omfatter den tilveiebrakte nukleinsyren og i tillegg en fjerde nukleinsyresekvens som gir resistens mot et tredje eukaryot seleksjonsmiddel, idet det tredje eukaryote seleksjonsmidlet er forskjellig fra det første eukaryote seleksjonsmidlet og også er forskjellig fra det andre eukaryote seleksjonsmidlet,
- c) transfektere CHO-cellen, idet transfeksjonen omfatter de følgende trinnene i følgende rekkefølge:
- (i) transfektere CHO-cellen med den første transfeksjonsvektoren,
 - (ii) velge en CHO-celle transfektert i (i) ved selektiv dyrking i dyrkningsmedium som inneholder et første eukaryot seleksjonsmiddel som den første transfeksjonsvektoren gir resistens mot,
 - (iii) transfektere den valgte CHO-cellen i (ii) med den andre transfeksjonsvektoren,
 - (iv) velge en CHO-celle transfektert i (iii) ved selektiv dyrking i dyrkningsmedium som inneholder det første eukaryote seleksjonsmidlet som den første transfeksjonsvektoren gir resistens mot, og det andre eukaryote seleksjonsmidlet som den andre transfeksjonsvektoren gir resistens mot,
 - (v) transfektere den valgte CHO-cellen i (iv) med den tredje transfeksjonsvektoren,
 - (vi) velge en CHO-celle transfektert i (v) ved selektiv dyrking i dyrkningsmedium som inneholder det første eukaryote seleksjonsmidlet som den første transfeksjonsvektoren gir resistens mot, og det andre eukaryote seleksjonsmidlet som den andre transfeksjonsvektoren gir

resistens mot, og det tredje eukaryote seleksjonsmidlet som den tredje transfeksjonsvektoren gir resistens mot, idet den første, andre og tredje transfeksjonsvektoren skiller seg fra hverandre bare den i nukleinsyren som gir resistens mot det første, andre og tredje eukaryote seleksjonsmidlet.

19. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 17 eller cellen ifølge krav 18, karakterisert ved at immunoglobulinet er et humant antistoff, eller et humanisert antistoff, eller et kimært antistoff eller et T-celleantigen-utarmet antistoff.

20. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 17 og 19 eller cellen ifølge et hvilket som helst av kravene 18 til 19, karakterisert ved at CHO-cellen er en CHO K1-celle (ATCC CCL-61 eller DSM ACC 110), eller en CHO DG44-celle (også kjent som CHO-DHFR[-], DSM ACC 126) eller en CHO XL99-celle, en CHO-T-celle (se f.eks. Morgan, D., et al., Biochemistry 26 (1987) 2959–2963), eller en CHO-S-celle, eller en Super-CHO-celle (Pak, S. C. O., et al., Cytotechnology. 22 (1996) 139–146).

21. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 17 og 19 til 20 eller cellen ifølge et hvilket som helst av kravene 18 til 20, karakterisert ved at den tunge og den lette kjeden inneholder en N-terminal forlengelse som er nødvendig for transport/utskilling av polypeptidet gjennom cellen i det ekstracellulære mediet.

22. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 17 og 19 til 21, karakterisert ved at fremgangsmåten er egnet for fremstilling av et utskilt heterologt immunoglobulin i stor skala.

23. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 17 og 19 til 22, karakterisert ved at dyrking utføres i et volum på minst 100 l, mer foretrukket minst 500 l, mest foretrukket minst 1000 l.

24. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 17 og 19 til 23, karakterisert ved at dyrkingen av den transfekterte CHO-cellen utføres i nærvær av det eukaryote seleksjonsmidlet i oppdyringsfermenteringene, og dyrkingen av den transfekterte CHO-

cellen utføres i fravær av de eukaryote seleksjonsmidlene i hovedfermenteringen, og at det utskilte heterologe immunoglobulinet utvinnes fra dyrkningsmediet uten de eukaryote seleksjonsmidlene.

25. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 17 og 19 til 24, karakterisert ved at de eukaryote seleksjonsmidlene tilsettes under vekstfasen og utelates under produksjonsfasen av CHO-cellen.

26. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 17 og 19 til 25 eller cellen ifølge et hvilket som helst av kravene 18 til 21, karakterisert ved at den spesifikke produktiviteten til den produserte CHO-cellen er mer enn $1 \mu\text{g}/10^6$ celler/d, fortrinnsvis mer enn $5 \mu\text{g}/10^6$ celler/d, mer foretrukket mer enn $10 \mu\text{g}/10^6$ celler/d.

27. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 17 og 19 til 26 eller cellen ifølge et hvilket som helst av kravene 18 til 21 og 26, karakterisert ved at det heterologe immunoglobulinet er et ferdigbehandlet utskilt heterologt immunoglobulin.

28. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 17 og 19 til 27, karakterisert ved at mediet som anvendes i dyrkingen er et serumfritt medium eller et serumfritt medium supplert med definerte komponenter fra pattedyr eller et medium fritt for animalske komponenter, eller et proteinfritt medium, et proteinfritt medium supplert med definerte animalske komponenter, eller et kjemisk definert medium, eller et medium fritt for komponenter fra pattedyr eller et definert proteinfritt medium.

29. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 17 og 19 til 28, karakterisert ved at mediet er det samme i alle trinn og er et medium egnet for storskalaproduksjon av det utskilte heterologe immunoglobulinet.

30. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 17 og 19 til 29, karakterisert ved at den omfatter som et siste trinn å rense det heterologe immunoglobulinet med ett eller flere kromatografiske trinn.

31. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 17 og 19 til 30 eller cellen ifølge et hvilket som helst av kravene 18-21 og 26 til 27 og 30, karakterisert ved at vektoren som CHO-cellen transfekteres med, og som omfatter en nukleinsyre som gir resistens mot et eukaryot seleksjonsmiddel, også omfatter en nukleinsyre som koder for den lette kjeden til det heterologe immunoglobulinet og en nukleinsyre som koder for den tunge kjeden til det heterologe immunoglobulinet, eller at hvis vektoren bare omfatter en nukleinsyre som koder for enten lettkjeden til immunoglobulinet eller tungkjeden til immunoglobulinet, transfekteres CHO-cellen også av en annen vektor som omfatter en nukleinsyre som koder for den tilsvarende andre kjeden av immunoglobulinet.