



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2970980 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/13 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2018.11.05
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2018.08.15
(86)	European Application Nr.	14768761.0
(86)	European Filing Date	2014.03.07
(87)	The European Application's Publication Date	2016.01.20
(30)	Priority	2013.03.15, US, 201361791094 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
	Designated Extension States:	BA; ME
(73)	Proprietor	Janssen Biotech, Inc., 800/850 Ridgeview Drive, Horsham, PA 19044, USA Janssen Biologics B.V., Einsteinweg 101, 2333 Leiden, Nederland
(72)	Inventor	FLIKWEERT, Marcel, Einsteinweg 101, NL-2333 CB Leiden, Nederland GOOCHEE, Charles, 200 Great Valley Parkway, Malvern, Pennsylvania 19355, USA MASLANKA, Francis, 200 Great Valley Parkway, Malvern, Pennsylvania 19355, USA NAGEL, Francisus Johannes Ignatius, Einsteinweg 101, NL-2333 CB Leiden, Nederland RYLAND, James, 200 Great Valley Parkway, Malvern, Pennsylvania 19355, USA SCHAFFER, Eugene, 200 Great Valley Parkway, Malvern, Pennsylvania 19355, USA
(74)	Agent or Attorney	OSLO PATENTKONTOR AS, Postboks 7007 M, 0306 OSLO, Norge

(54)	Title	MANUFACTURING METHODS TO CONTROL C-TERMINAL LYSINE, GALACTOSE AND SIALIC ACID CONTENT IN RECOMBINANT PROTEINS
------	-------	--

(56)	References Cited:	WO-A1-2014/143184, CAI ET AL.: 'C-terminal lysine processing of human immunoglobulin G2 heavy chain in vivo' BIOTECHNOL BIOENG vol. 108, no. 2, 09 September 2010, pages 404 - 412, XP055129757, JUN LUO ET AL: "Probing of C-terminal lysine variation in a recombinant monoclonal antibody production using Chinese hamster ovary cells with chemically defined media", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 109, no. 9, 11 September 2012
------	-------------------	--

(2012-09-11), pages 2306-2315, XP55064498, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/bit.24510, LUO ET AL.: 'Probing of C-terminal lysine variation in a recombinant monoclonal antibody production using Chinese hamster ovary cells with chemically defined media' BIOTECHNOL BIOENG vol. 109, no. 9, 11 April 2012, pages 2306 - 2315, XP055064498, US-B2- 7 070 775, DICK ET AL.: 'C-terminal lysine variants in fully human monoclonal antibodies: investigation of test methods and possible causes' BIOTECHNOL BIOENG. vol. 100, no. 6, 04 March 2008, pages 1132 - 1143, XP055064805, JY PARK & J. JONGSTRA-BILEN: "Interactions between membrane IgM and the cytoskeleton involve the cytoplasmic domain of the immunoglobulin receptor", EUR. J. IMMUNOL., vol. 27, no. 11, November 1997 (1997-11), pages 3001-3009,, WO-A1-2009/126564, GHADERI ET AL.: 'Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation' BIOTECHNOL GENET ENG REV vol. 28, 2012, pages 147 - 175, XP055085526, WO-A1-2012/147053, WO-A2-2013/009648

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 ved fremstilling av et antistoff eller et antigen-bindende fragment derav som har et C-terminalt lysininnhold fra 20% til 70% og et sialinsyreinnhold fra 1% til 20%, hvilken fremgangsmåte omfatter å:
- 5 dyrke en sink-responsiv vertcelle som er transfisert med DNA som koder for antistoffet, i et kulturmedium omfattende 0,5 μM til 6,5 μM sink; og regulere konsentrasjonen av sink i kulturmediet, hvorved antistoffet eller det antigen-bindende fragment derav dannes.
- 2.** Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor:
- 10 a) det C-terminale lysininnhold av antistoffet er 40% til 70%, valgfritt 55% til 65% og valgfritt 60%; og/eller
- b) sialinsyreinnholdet av antistoffet er 3% til 14%.
- 3.** Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller krav 2, hvor antistoffet eller det antigen-bindende fragment derav er et anti-TNF α -antistoff eller et antigen-bindende
- 15 fragment derav, hvor anti-TNF α -antistoffet eller det antigen-bindende fragment derav (i) kompetitivt hemmer binding av det monoklonale antistoff produsert fra hybridomaen deponert under ATCC-aksesjonsnr. PTA-7045 til humant TNF α ; og (ii) bindes til en nøytraliserende epitop av humant TNF α med en affinitet på minst 1×10^8 liter/mol, målt som en assosiasjonskonstant (K_a).
- 20 **4.** Fremgangsmåte ifølge krav 3, hvor anti-TNF α -antistoffet eller det antigen-bindende fragment derav er:
- a) et humant antistoff;
- b) et humanisert eller kimært antistoff;
- c) av immunoglobulinklasse IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 eller IgM, valgfritt hvor
- 25 anti-TNF α -antistoffet eller det antigen-bindende fragment derav omfatter en IgG1-konstant region; eller
- d) valgt fra gruppen bestående av Fab, Fab', F(ab')₂ og Fv.
- 5.** Fremgangsmåte ifølge krav 3, hvor
- a) den lette kjede omfatter alle antigen-bindende regioner av den lette kjede
- 30 av det monoklonale antistoff produsert fra hybridomaen deponert under ATCC-aksesjonsnr. PTA-7045;

b) den tunge kjede omfatter alle antigen-bindende regioner av den tunge kjede av det monoklonale antistoff produsert fra hybridomaen deponert under ATCC-aksesjonsnr. PTA-7045; eller

5 c) den lette kjede omfatter alle antigen-bindende regioner av den lette kjede av det monoklonale antistoff produsert fra hybridomaen deponert under ATCC-aksesjonsnr. PTA-7045, og den tunge kjede omfatter alle antigen-bindende regioner av den tunge kjede av det monoklonale antistoff produsert fra hybridomaen deponert under ATCC-aksesjonsnr. PTA-7045.

10 **6.** Fremgangsmåte ifølge krav 5, hvor anti-TNF α -antistoffet eller det antigen-bindende fragment derav omfatter en ikke-human variabel region omfattende en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5, valgfritt hvor den ikke-humane variable region omfatter et polypeptid som kodes for av en nukleinsyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 2 og SEQ ID NO: 4.

15 **7.** Fremgangsmåte ifølge krav 3 eller krav 4, hvor anti-TNF α -antistoffet eller det antigen-bindende fragment derav har epitopisk spesifisitet som er identisk med infliximab, valgfritt hvor anti-TNF α -antistoffet eller det antigen-bindende fragment derav er infliximab.

8. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-7, hvor:
20 a) konsentrasjonen av sink i kulturmediet er i området fra 0,6 μ M til 6,5 μ M, valgfritt hvor konsentrasjonen av sink i kulturmediet er i området fra 0,6 μ M til 1,1 μ M; og/eller
b) kulturmediet ytterligere omfatter samlet EDTA i et konsentrasjonsområde fra 2,5 μ M til 30 μ M, og fremgangsmåten ytterligere omfatter å regulere
25 konsentrasjonen av jern-fritt EDTA i kulturmediet, valgfritt hvor kulturmediet ytterligere omfatter fritt EDTA i et konsentrasjonsområde fra 5 μ M til 16 μ M.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 8, ytterligere omfattende å isolere antistoffet eller det antigen-bindende fragment derav.

30 **10.** Fremgangsmåte ifølge krav 9, hvor antistoffet isoleres når de sink-responsive vertceller i kulturmediet når en celletetthet fra 1,5 millioner celler per mL til 11 millioner celler per mL, valgfritt en celletetthet fra 3 millioner celler per mL til 11 millioner celler per mL.

11. Fremgangsmåte ifølge krav 9 eller krav 10, hvor konsentrasjonen av sink reguleres inntil antistoffet eller det antigen-bindende fragment derav isoleres.

12. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-11, hvor:

- a) konsentrasjonen av sink reguleres under en eksponentiell vekstfase av de
5 sink-responsive vertceller;
- b) reguleringen av sinkkonsentrasjonen omfatter å overvåke konsentrasjonen av sink i kulturmediet og å regulere konsentrasjonen av sink i kulturmediet, slik at konsentrasjonen av sink i kulturmediet er minst 0,5 μM , valgfritt i området fra 0,6 μM til 6,5 μM ;
- 10 c) antistoffet har et galaktoseinnhold fra 50% til 90%, valgfritt 45% til 85%;
- d) antistoffet har et forhold mellom sialinsyre og galaktose fra 0,05 til 0,20; og/eller
- e) den sink-responsive vertcelle er en SP2/0-celle.

13. Fremgangsmåte for å regulere:

- 15 a) det C-terminale lysininnhold av et antistoff eller et antigen-bindende fragment derav som har et C-terminalt lysininnhold fra 20% til 70%;
- b) sialinsyreinnholdet av et antistoff eller et antigen-bindende fragment derav som har et sialinsyreinnhold fra 1% til 20%;
- c) galaktoseinnholdet av et antistoff eller et antigen-bindende fragment derav
20 som har et galaktoseinnhold fra 50% til 90%; og/eller
- d) forholdet mellom sialinsyre og galaktose i et antistoff som har et forhold mellom sialinsyre og galaktose fra 0,05 til 0,20,
i en fremgangsmåte for biosyntese av antistoffet eller det antigen-bindende fragment derav i et kulturmedium, hvilken fremgangsmåte omfatter å:
25 overvåke et nivå av sink i kulturmediet under biosyntese av antistoffet eller det antigen-bindende fragment derav; og
justere nivået av sink i kulturmediet under biosyntese av antistoffet eller det antigen-bindende fragment derav.

- 14.** Fremgangsmåte ifølge krav 13, hvor antistoffet eller det antigen-bindende
30 fragment derav er et anti-TNF α -antistoff eller et antigen-bindende fragment derav, valgfritt hvor antistoffet eller det antigen-bindende fragment derav er et anti-TNF α -antistoff eller et antigen-bindende fragment derav, hvor anti-TNF α -antistoffet eller det antigen-bindende fragment derav (i) kompetitivt hemmer binding av det monoklonale antistoff produsert fra hybridomaen deponert under ATCC-aksesjonsnr.
35 PTA-7045 til humant TNF α ; og (ii) bindes til en nøytraliserende epitop av humant

TNF α med en affinitet på minst 1×10^8 liter/mol, målt som en assosiasjonskonstant (K_a).

- 15.** Fremgangsmåte ifølge krav 14, hvor antistoffet eller det antigen-bindende fragment derav er et anti-TNF α -antistoff eller et antigen-bindende fragment derav
5 som har epitopisk spesifisitet identisk med infliximab, valgfritt hvor antistoffet er infliximab, så som hvor antistoffet biosyntetiseres av en SP2/0-cellelinje.