



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3110961 B1

NORWAY

(19) NO

(51) Int Cl.

C12P 21/00 (2006.01) C12N 1/38 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)

C12N 1/00 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2020.02.03
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2019.11.27
(86)	European Application Nr.	15709430.1
(86)	European Filing Date	2015.02.24
(87)	The European Application's Publication Date	2017.01.04
(30)	Priority	2014.02.27, EP, 14157030
(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	F. Hoffmann-La Roche AG, Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, Sveits
(72)	Inventor	POPP, Oliver, Flößerstrasse 15, 82377 Penzberg, Tyskland BEAUCAMP, Nicola, Romanstrasse 17, 80639 Muenchen, Tyskland DRABNER, Georg, Hochstrasse 19 B, 81669 Muenchen, Tyskland ESSLINGER, Stephanie, Max- Lebsche-Platz 38, 81377 Muenchen, Tyskland
(74)	Agent or Attorney	PLOUGMANN VINGTOFT, Postboks 1003 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54) Title **MODULATION OF CELL GROWTH AND GLYCOSYLATION IN RECOMBINANT GLYCOPROTEIN PRODUCTION**

(56) References
Cited: WO-A1-2011/019622, US-A1- 2007 161 084, WO-A1-2011/095596, WO-A1-2013/114245, EP-A2- 1 096 017, WO-A1-2008/008360, WO-A1-99/61650, WO-A1-2008/109410
BELCARZ<A> A ET AL: "The novel non-glycosylated invertase from Candida utilis (the properties and the conditions of production and purification)", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. PROTEIN STRUCTURE AND MOLECULAR ENZYMOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM; NL, vol. 1594, no. 1, 31 January 2002 (2002-01-31), pages 40-53, XP004334740, ISSN: 0167-4838, DOI: 10.1016/S0167-4838(01)00279-5
SAUER P W ET AL: "A high-yielding, generic fed-batch cell culture process for production of recombinant antibodies", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, WILEY, US, vol. 67, no. 5, 5 March 2000 (2000-03-05), pages 585-597, XP002690472, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(20000305)67:5<585: :AID-BIT9>3.0.CO;2-H [retrieved on 2000-03-26]
KIM S-G ET AL: "Coexpression of folding accessory proteins for production of active cyclodextrin glycosyltransferase of Bacillus macerans in recombinant Escherichia coli", PROTEIN

EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, vol. 41, no. 2, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 426-432, XP004875134, ISSN: 1046-5928, DOI: 10.1016/J.PEP.2005.01.017

SIMMONS L C ET AL: "Expression of full-length immunoglobulins in Escherichia coli: rapid and efficient production of aglycosylated antibodies", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 263, no. 1-2, 1 May 2002 (2002-05-01) , pages 133-147, XP004354391, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/S0022-1759(02)00036-4

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 å fremstille et rekombinant glykoprotein under fermenteringskulturbetingelser i en eukaryot celle, idet fremgangsmåten omfatter å justere konsentrasjonen av hver av jern, kobber, sink og mangan i næringsmediet under dyrkingen for å påvirke produksjonen av biomasse og/eller N-glykan-modenhet i det uttrykte glykoproteinet, idet justeringen består i å:

- øke konsentrasjonen av hver av jern, kobber, sink og mangan for å øke biomassen, idet konsentrasjonene blir justert til:

- (a) jern – fra 15 μM til mer enn 80 μM ;

- (b) kobber – fra 0,3 μM til mer enn 2,5 μM ;

- (c) sink – fra 20 μM til mer enn 50 μM ; og

- (d) mangan – fra 0,01 μM til mer enn 3 μM ; og/eller

- øke konsentrasjonen av hver av sink og mangan og, eventuelt, redusere konsentrasjonen av hver av jern og kobber for å øke N-glykan-modenhet i det uttrykte glykoproteinet, idet karbohydratdelen av det uttrykte glykoproteinet har en G0-, G1- eller G2-struktur; eller

- (i) redusere konsentrasjonen av hver av jern, kobber, sink og mangan for å øke produksjonen av umodne ikke-fukosylerte glykoproteiner eller (ii) øke konsentrasjonen av hver av kobber og jern og redusere konsentrasjonen av hver av sink og mangan for å øke produksjonen av umodne ikke-fukosylerte glykoproteiner;

idet en reduksjon i konsentrasjonen av noen eller alle av jern, kobber, sink og mangan i næringsmediet oppnås ved å kompleksere jern, kobber, sink og mangan med en kelatdanner og/eller ved å utså cellene i et friskt medium som inneholder en lavere konsentrasjon av noen eller alle av jern, kobber, sink og mangan enn mediet i den umiddelbart foregående kulturfasen.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor det uttrykte glykoproteinet er et modent N-glykosylert glykoprotein, et modent ikke-fukosylert glykoprotein eller et umodent ikke-fukosylert glykoprotein.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor konsentrasjonene, for å øke N-glykan-modenhet i det uttrykte glykoproteinet, blir justert til:

- (a) jern – fra 0 μM til 25 μM ;

- (b) kobber – fra 0 μM til 0,1 μM ;
 - (c) sink – fra 20 μM til mer enn 50 μM ; og
 - (d) mangan – fra 0,01 μM til mer enn 3 μM .
4. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor konsentrasjonene, for å øke N-glykanmodenhet i det uttrykte glykoproteinet, blir justert til:
- (a) sink – fra 20 μM til mer enn 50 μM ; og
 - (b) mangan – fra 0,01 μM til mer enn 3 μM .
5. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor konsentrasjonene, for å øke produksjonen av umodne ikke-fukosylerte glykoproteiner, blir justert til enten:
- (i)
 - (a) jern – fra 0 μM til 35 μM ;
 - (b) kobber – fra 0 μM til 1 μM ;
 - (c) sink – fra 0 μM til 20 μM ; og
 - (d) mangan – fra 0 μM til 0,01 μM ; eller
 - (ii)
 - (a) jern – fra 15 μM til mer enn 80 μM ;
 - (b) kobber – fra 0,3 μM til mer enn 2,5 μM ;
 - (c) sink – fra 0 μM til 20 μM ; og
 - (d) mangan – fra 0 μM til 0,01 μM .
6. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5, hvor glykoproteinet er eksogent eller endogent for den eukaryote cellen, eventuelt hvor glykoproteinet er et strukturelt glykoprotein, hormon, antistoff eller enzym.
7. Fremgangsmåte ifølge krav 6, hvor glykoproteinet er et antistoff, eventuelt hvor antistoffet er et terapeutisk eller diagnostisk antistoff, eventuelt et kimært, humanisert eller humant antistoff.
8. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, karakterisert ved at den eukaryote cellen er en pattedyrceelle, en gjærceelle eller en insektceelle.
9. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, hvor konsentrasjonene av jern, kobber, sink og mangan blir justert under vekst- og/eller produksjonskulturfasene.
10. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9, hvor en økning i konsentrasjonen av noen eller alle av jern, kobber, sink og mangan i næringsmediet oppnås ved å supplere mediet der cellene dyrkes, og/eller

ved å splitte cellene inn i et friskt medium supplementert med noen eller alle av jern, kobber, sink og mangan.

11. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 10, hvor konsentrasjonen av hver av jern, kobber, sink og mangan i næringsmediet blir justert under dyrkingen, for det første for å favorisere produksjon av biomasse og dernest for å øke N-glykan-modenheten i uttrykte N-glykoproteiner eller for å øke produksjonen av umodne ikke-fukosylerte glykoproteiner.