



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3350318 B1

NORWAY

(19) NO

(51) Int Cl.

C12N 5/0784 (2010.01)

C07K 14/54 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 35/15 (2015.01)

C07K 14/57 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C07K 14/525 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 14/535 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2022.08.29
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2022.04.13
(86)	European Application Nr.	16847253.8
(86)	European Filing Date	2016.09.14
(87)	The European Application's Publication Date	2018.07.25
(30)	Priority	2015.09.15, US, 201562219058 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
(73)	Proprietor	NorthWest Biotherapeutics, Inc., 4800 Montgomery Lane, Suite 800, Bethesda, MD 20814, USA
(72)	Inventor	BOSCH, Marnix, L., 1735 90th Avenue Notheast, Clyde Hill, WA 98004, USA
(74)	Agent or Attorney	ZACCO NORWAY AS, Postboks 488, 0213 OSLO, Norge

(54) Title **METHODS RELATING TO ACTIVATED DENDRITIC CELL COMPOSITIONS FOR SUBJECTS WITH ADVANCED CANCERS**

(56) References
Cited: WO-A1-2004/039968, WO-A1-2016/048872, US-A1- 2010 330 057,
CHERYL L-L CHIANG ET AL: "Optimizing parameters for clinical-scale production of high IL-12 secreting dendritic cells pulsed with oxidized whole tumor cell lysate", JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE, BIOMED CENTRAL, vol. 9, no. 1, 14 November 2011 (2011-11-14), page 198, XP021130928, ISSN: 1479-5876, DOI: 10.1186/1479-5876-9-198
JIN PING ET AL: "Molecular signatures of maturing dendritic cells: implications for testing the quality of dendritic cell therapies", JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE, BIOMED CENTRAL, vol. 8, no. 1, 15 January 2010 (2010-01-15), page 4, XP021068349, ISSN: 1479-5876
HAEGEL-KRONENBERGER, H ET AL.: 'Adhesive and/or Signaling Functions of CD 44 Isoforms in Human Dendritic Cells.' THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY vol. 161, no. 8, 15 October 1998, pages 3902 - 3911, XP055371525
ALINE ZIMMER ET AL: "A regulatory dendritic cell signature correlates with the clinical efficacy of allergen-specific sublingual immunotherapy", JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 129, no. 4, 23 March 2012 (2012-03-23), pages 1020-1030, XP055536213, AMSTERDAM, NL ISSN: 0091-6749, DOI: 10.1016/j.jaci.2012.02.014

MITSUHASHI MASATO ET AL: "Discovery of Unique Biomarkers Which Predict Clinical Responses to Dendritic Cell Vaccine", JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, US , vol. 35, no. 9 31 October 2012 (2012-10-31), page 743, XP009516361, ISSN: 1524-9557 Retrieved from the Internet:
 URL:<http://journals.lww.com/immunotherapy-journal/pages/default.aspx>

STRIOGA MARIUS M ET AL: "Therapeutic Dendritic Cell-Based Cancer Vaccines: The State of the Art", CRITICAL REVIEWS IN IMMUNOLOGY, CRC PRESS, INC, US, vol. 33, no. 6, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 489-547, XP009178543, ISSN: 1040-8401, DOI: 10.1615/CRITREVIMMUNOL.2013008033

DATTA, J ET AL.: 'Optimizing Dendritic Cell -Based Approaches for Cancer Immunotherapy.' THE YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE. vol. 87, no. 4, 12 December 2014, pages 491 - 518, XP055371523

DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; March 2014 (2014-03), YIN ZHILIN ET AL: "Antitumor efficacy of argon-helium cryoablation-generated dendritic cell vaccine in glioma", XP002792224, Database accession no. PREV201400280598 & NEUROREPORT, vol. 25, no. 4, March 2014 (2014-03), pages 199-204, ISSN: 0959-4965(print), DOI: 10.1097/WNR.0000000000000045

BUTTERFIELD LISA H ET AL: "Development of a potency assay for human dendritic cells: IL-12p70 production", JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, US, vol. 31, no. 1, 31 December 2007 (2007-12-31), pages 89-100, XP009516379, ISSN: 1524-9557, DOI: 10.1097/CJI.0B013E318158FCE0

HELLMAN ET AL: "Early Activation Markers of Human Peripheral Dendritic Cells", HUMAN IMMUNOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 68, no. 5, 24 April 2007 (2007-04-24) , pages 324-333, XP022042793, ISSN: 0198-8859, DOI: 10.1016/J.HUMIMM.2007.01.018

DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; November 2008 (2008-11), HEALEY DON G ET AL: "IL-12 as an Immunopotency Marker for Fully Autologous Dendritic Cell Immunotherapeutics", XP002794707, Database accession no. PREV200900064535 & JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, vol. 31, no. 9, November 2008 (2008-11), page 936, 23RD ANNUAL MEETING OF THE INTERNATIONAL-SOCIETY-FOR-BIOLOGICAL-THERAPY-OF-CANCER; SAN DIEGO, CA, USA; 20081030, ISSN: 1524-9557

EUI-HONG BYUN ET AL: "Rv0315, a novel immunostimulatory antigen of, activates dendritic cells and drives Th1 immune responses", JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 90, no. 3, 13 October 2011 (2011-10-13), pages 285-298, XP035024440, ISSN: 1432-1440, DOI: 10.1007/S00109-011-0819-2

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. *In vitro*-fremgangsmåte for å bestemme den immunterapeutiske virkeevnen til en aktivert ikke fullt moden human dendrittisk cellesammensetning for anvendelse i behandling av en fast tumor, der fremgangsmåten omfatter trinnene:

- i) å fremstille aktiverte dendrittiske celler som ikke har blitt fullt modnet som målt ved å beholde evnen til effektivt å ta opp og bearbeide antigen;
- ii) å bestemme de relative mengdene av interleukin 6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8), interleukin 12 p40 (IL-12 p40) og tumornekrosefaktor α (TNF α) av den aktiverte og ikke fullt modne dendrittiske cellesammensetningen;
- iii) å sammenligne den bestemte mengden av IL-6, IL-8, IL-12 p40 og TNF α med en terskelmengde; og
- iv) å bestemme at den aktiverte og ikke fullt modne humane dendrittiske cellesammensetningen har lav immunterapeutisk virkeevne hvis alle IL-6, IL-8, IL-12 p40 og TNF α er under terskelverdien; eller at den aktiverte og ikke fullt modne humane dendrittiske cellesammensetningen har høy immunterapeutisk virkeevne hvis alle av IL-6, IL-8, IL-12 p40 og TNF α er over terskelverdien.

2. *In vitro*-fremgangsmåte for å velge en pasient som har en fast tumor som vil reagere eller ikke reagere på administrering av aktiverte ikke fullt modne humane dendrittiske celler, ved å bestemme den immunterapeutiske virkeevnen til en aktivert og ikke fullt moden human dendrittisk cellesammensetning avledet fra pasienten, der fremgangsmåten omfatter trinnene:

- i) å fremstille en sammensetning omfattende aktiverte og ikke fullt modne humane dendrittiske celler som målt ved å beholde evnen til effektivt å ta opp og bearbeide antigen;
- ii) å bestemme de relative mengdene av IL-6, IL-8, IL-12 p40 og TNF α av de aktiverte og ikke fullt modne dendrittiske cellene;
- iii) å sammenligne den bestemte mengden av IL-6, IL-8, IL-12 p40 og TNF α med en terskelmengde; og
- iv) å bestemme at den aktiverte og ikke fullt modne humane dendrittiske cellesammensetningen har lav immunterapeutisk virkeevne hvis alle IL-6, IL-8, IL-12 p40 og TNF α er under terskelverdien eller at den aktiverte og ikke fullt

modne humane dendritiske cellesammensetningen har høy immunterapeutisk virkeevne hvis alle av IL-6, IL-8, IL-12 p40 og TNF α er over terskelen, og å velge de pasientene over terskelen som pasienter som vil reagere eller velge de pasientene under terskelen som pasienter som ikke vil reagere.

5

3. *In vitro*-fremgangsmåte for å velge et dendritiske cellemodningsmiddel for å produsere aktiverte og ikke fullt modne humane dendritiske celler med økt immunterapeutisk virkeevne for anvendelse i behandling av en fast tumor, der fremgangsmåten omfatter trinnene:

10

i) å fremstille aktiverte og ikke fullt modne humane dendritiske celler ved å bringe umodne dendritiske celler i kontakt med et testmiddel for dendritisk cellemodning i en tidsperiode som er tilstrekkelig til å indusere modning av de umodne dendritiske cellene, men ikke tillate de dendritiske cellene å modnes fullt ut, som bestemt av evnen til de dendritiske cellene til effektivt å ta opp og

15

bearbeide antigen;
ii) å bestemme de relative mengdene av IL-6, IL-8, IL-12 p40 og TNF α ;
iii) å sammenligne den bestemte mengden av IL-6, IL-8, IL-12 p40 og TNF α med en terskelmengde; og

20

iv) å bestemme at den aktiverte og ikke fullt modne humane dendritiske cellesammensetningen har lav immunterapeutisk virkeevne hvis alle IL-6, IL-8, IL-12 p40 og TNF α er under terskelverdien eller at den aktiverte og ikke fullt modne dendritiske cellesammensetningen har høy immunterapeutisk virkeevne hvis alle av IL-6, IL-8, IL-12 p40 og TNF α er over terskelen, og å velge det dendritiske cellemodningsmidlet som induserer *in vitro*-produksjonen av den

25

aktiverte og ikke fullt modne dendritiske cellesammensetningen over terskelen.
4. *In vitro*-fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til og med 3, hvori de aktiverte og ikke fullt modne humane dendritiske cellene produserer 50 til 200 ng/1 million celler/24 timer med IL-6; 500 til 2000 ng/1 million celler/24 timer med IL-8; og/eller minst 75 til 100 ng/1 million celler/24 timer av IL-12 p40-underenheten.

30

5. *In vitro*-fremgangsmåten ifølge krav 4, hvori de humane aktiverte ikke fullt modne dendritiske cellene produserer 75 til 150 ng/1 million celler/24 timer

EP3350318

3

med IL-6; 750 til 1500 ng/1 million celler/24 timer med IL-8; og/eller minst 100 ng/1 million celler/24 timer med IL-12 p40; foretrukket hvori de aktiverte og ikke fullt modne dendritiske cellene produserer 100 ng/1 million celler/24 timer med IL-6, og 1000 ng/1 million celler/24 timer med IL-8, og/eller minst 100 ng/1 million celler/24 timer med IL-12 p40.

6. *In vitro*-fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til og med 5, hvori de aktiverte og ikke fullt modne humane dendritiske cellene fremstilles ved de følgende trinnene:

- i) å isolere en cellepopulasjon omfattende humane perifere blodmononukleære celler (PBMC-er) fra perifert blod;
- ii) å berike cellepopulasjonen omfattende humane PBMC-er for humane monocytiske dendritiske celleforløpere;
- iii) å dyrke cellepopulasjonen beriket for humane monocytiske dendritiske celleforløpere med et vevsdyrkingsmedium supplert med en effektiv mengde av et dendrittisk celledifferensieringsmiddel i en tidsperiode som er tilstrekkelig til å differensiere de humane monocytiske dendritiske celleforløperne til umodne humane dendritiske celler;
- iv) å dyrke cellepopulasjonen beriket for umodne humane dendritiske celler med en effektiv mengde av et dendrittisk cellemodningsmiddel, for å aktivere og ikke fullt modne de umodne humane dendritiske cellene som bestemt av effektiviteten til de humane dendritiske cellene til å ta opp og bearbeide antigen; og
- v) å isolere og vaske de aktiverte og ikke fullt modne humane dendritiske cellene.

7. *In vitro*-fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til og med 5, hvori de aktiverte og ikke fullt modne humane dendritiske cellene fremstilles ved de følgende trinnene:

- i) å isolere en cellepopulasjon beriket for og omfattende humane monocytiske dendritiske celleforløpere;
- ii) å dyrke cellepopulasjonen beriket for humane monocytiske dendritiske celleforløpere med et vevsdyrkingsmedium supplert med en effektiv mengde av et dendrittisk celledifferensieringsmiddel i en tidsperiode som er tilstrekkelig til å

EP3350318

4

differensiere de humane monocytiske dendritiske celleforløperne til umodne humane dendritiske celler;

- 5 iii) å dyrke cellepopulasjonen beriket for umodne humane dendritiske celler med en effektiv mengde av et dendritiske cellemodningsmiddel for å aktivere og indusere modningen av de umodne dendritiske cellene; og
- iv) å isolere og vaske de aktiverte og ikke fullt modne humane dendritiske cellene.

10 **8.** *In vitro*-fremgangsmåten ifølge krav 6 eller 7, hvori de humane monocytiske dendritiske celleforløperne er oppnådd fra hud, milt, benmarg, thymus, lymfeknuter, navlestrengsblod eller perifert blod.

15 **9.** *In vitro*-fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 6 til 8, hvori de humane monocytiske dendritiske celleforløperne er ikke-aktiverte humane monocytiske dendritiske celleforløpere.

20 **10.** *In vitro*-fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 6 til 9, hvori de humane monocytiske dendritiske celleforløperne oppnås fra det enkelte individet som skal behandles for den faste tumoren; eller hvori de humane monocytiske dendritiske celleforløperne oppnås fra et friskt enkelt individ HLA-matchet med det enkelte individet som skal behandles for den faste tumoren.

25 **11.** *In vitro*-fremgangsmåten ifølge krav 6 eller 7, hvori det humane dendritiske celledifferensieringsmidlet er GM-CSF uten noe annet cytokin eller GM-CSF i kombinasjon med IL-4, IL-7, IL-13 eller IL-15.

30 **12.** *In vitro*-fremgangsmåten ifølge krav 6 eller 7, hvori det humane dendritiske cellemodningsmidlet er inaktivert Bacillus Calmette-Guerin (BCG), interferon γ (IPN γ), lipopolysakkarid (LPS), tumornekrosefaktor α (TNF α), en imidazokinolinforbindelse, et syntetisk dobbelttrådet polyribonukleotid, en agonist av en toll-lignende reseptor (TLR), en sekvens av nukleinsyrer som inneholder umetylerte CpG-motiver kjent for å indusere modningen av dendritiske celler eller hvilken som helst kombinasjon derav; foretrukket hvori modningsmidlet er en kombinasjon av BCG og IPN γ , og det syntetiske

dobbeltrådet polyribonukleotidet er poly[I]:poly[C(12)U].

5 **13.** *In vitro*-fremgangsmåten ifølge krav 12, hvori det inaktiverte BCG-et omfatter hel BCG, celleveggbestanddeler av BCG, BCG-avledede lipoarabidomannaner eller BCG-komponenter; foretrukket hvori det inaktiverte BCG-et er varmeinaktivert BCG, formalinbehandlet BCG eller varmeinaktivert og formalinbehandlet BCG.

10 **14.** *In vitro*-fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 12 eller 13, hvori den effektive mengden BCG er 10^5 til 10^7 cfu per milliliter vevsdyrkingsmedier og den effektive mengden IFN γ er 100 til 1000 enheter per milliliter vevsdyrkingsmedier.

15 **15.** *In vitro*-fremgangsmåten ifølge krav 12, hvori imidazokinolinforbindelsen er en imidazokinolin-4-aminforbindelse; foretrukket hvori imidazokinolin-4-aminforbindelsen er 4-amino-2-etoksymetyl- α,α -dimetyl-1H-imidazol[4,5-c]kinolin-1-5-etanol eller 1-(2-metylpropyl)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-4-amin eller et derivat derav.