



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3630977 B1

NORWAY

(19) NO

(51) Int Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/67 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2024.04.29
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2024.02.21
(86)	European Application Nr.	18734359.5
(86)	European Filing Date	2018.06.02
(87)	The European Application's Publication Date	2020.04.08
(30)	Priority	2017.06.02, US, 201762514754 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	Ambrex, Inc., 10975 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, USA
(72)	Inventor	CHEN, Sigeng, 10704 Ballystock Court, San Diego, CA 92131, USA LU, Yingchun, 6291 Sunrose Crest Way, San Diego, CA 92130, USA TIAN, Feng, 8374 Orange Haven Place, San Diego, CA 92129, USA
(74)	Agent or Attorney	AWA NORWAY AS, Postboks 1052 Hoff, 0218 OSLO, Norge

(54)	Title	METHODS AND COMPOSITIONS FOR PROMOTING NON-NATURAL AMINO ACID-CONTAINING PROTEIN PRODUCTION
(56)	References Cited:	WO-A1-2016/066995, WO-A1-2010/141851, WO-A1-2008/127900, WO-A2-2009/151591, BO ZHANG ET AL: "CRISPRi-Manipulation of Genetic Code Expansion via RF1 for Reassignment of Amber Codon in Bacteria", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 6, no. 1, 28 January 2016 (2016-01-28), XP055503936, DOI: 10.1038/srep20000 QIAN WANG ET AL: "Genetic Incorporation of Unnatural Amino Acids into Proteins in Yeast", METHODS MOL BIOL., vol. 794, 26 August 2011 (2011-08-26), pages 199-213, XP055767993, US ISSN: 1064-3745, DOI: 10.1007/978-1-61779-331-8_12 ISBN: 978-1-4939-7374-3 ILEGEMS E ET AL: "Downregulation of eRF1 by RNA interference increases mis-acylated tRNA suppression efficiency in human cells", PROTEIN ENGINEERING, DESIGN AND SELECTION, OXFORD JOURNAL, LONDON, GB, vol. 17, no. 12, 16 February 2005 (2005-02-16), pages 821-827, XP003016883, ISSN: 1741-0126, DOI: 10.1093/PROTEIN/GZH096 M.J. LAJOIE ET AL: "Genomically Recoded Organisms Expand Biological Functions", SCIENCE, vol. 342, no. 6156, 18 October 2013 (2013-10-18), pages 357-360, XP055257375, DOI: 10.1126/science.1241459 ABHISHEK CHATTERJEE ET AL: "A Genetically Encoded Fluorescent Probe in Mammalian Cells", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 135, no. 34, 7 August 2013 (2013-08-07), pages 12540-12543, XP055503917, US ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/ja4059553 SHAHRAM MISAGHI ET AL: "Resilient immortals, characterizing and utilizing Bax/Bak deficient Chinese hamster ovary (CHO) cells for high titer antibody production", BIOTECHNOLOGY PROGRESS., vol. 29, no. 3, 18 April 2013 (2013-04-18), pages 727-737, XP055504016, US ISSN: 8756-7938, DOI: 10.1002/btpr.1722

NANGLE L A ET AL: "Global Effects of Mistranslation from an Editing Defect in Mammalian Cells", CHEMISTRY AND BIOLOGY, CURRENT BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 13, no. 10, 20 October 2006 (2006-10-20), pages 1091-1100, XP027991142, ISSN: 1074-5521 [retrieved on 2006-10-01]

CHIN J W: "Expanding and reprogramming the genetic code of cells and animals", ANNUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY, PALTO ALTO, CA, US, vol. 83, 10 February 2014 (2014-02-10), pages 379-408, XP002753743, ISSN: 0066-4154, DOI: 10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-060713-035737 [retrieved on 2014-02-10]

JAMES S. ITALIA ET AL: "Expanding the genetic code of mammalian cells", BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, vol. 45, no. 2, 13 April 2017 (2017-04-13) , pages 555-562, XP055504089, GB ISSN: 0300-5127, DOI: 10.1042/BST20160336

SARIT COHEN ET AL: "Single-Plasmid-Based System for Efficient Noncanonical Amino Acid Mutagenesis in Cultured Mammalian Cells", CHEMBIOCHEM, vol. 17, no. 11, 27 April 2016 (2016-04-27), pages 1008-1011, XP055767887, ISSN: 1439-4227, DOI: 10.1002/cbic.201500681

ANGELA R. PARRISH ET AL: "Expanding the Genetic Code of Caenorhabditis elegans Using Bacterial Aminoacyl-tRNA Synthetase/tRNA Pairs", ACS CHEMICAL BIOLOGY, vol. 7, no. 7, 11 May 2012 (2012-05-11), pages 1292-1302, XP055768002, ISSN: 1554-8929, DOI: 10.1021/cb200542j

ANGELA R. PARRISH ET AL: "Expanding the Genetic Code of Caenorhabditis elegans Using Bacterial Aminoacyl-tRNA Synthetase/tRNA Pairs", ACS CHEMICAL BIOLOGY, vol. 7, no. 7, 11 May 2012 (2012-05-11), pages 1292-1302, XP55768002, ISSN: 1554-8929, DOI: 10.1021/cb200542j

SARIT COHEN ET AL: "Single-Plasmid-Based System for Efficient Noncanonical Amino Acid Mutagenesis in Cultured Mammalian Cells", CHEMBIOCHEM, vol. 17, no. 11, 27 April 2016 (2016-04-27), pages 1008-1011, XP55767887, ISSN: 1439-4227, DOI: 10.1002/cbic.201500681

QIAN WANG ET AL: "Genetic Incorporation of Unnatural Amino Acids into Proteins in Yeast", METHODS MOL BIOL., vol. 794, 26 August 2011 (2011-08-26), pages 199-213, XP55767993, US ISSN: 1064-3745, DOI: 10.1007/978-1-61779-331-8_12 ISBN: 978-1-4939-7374-3

WANG QIAN ET AL: "New methods enabling efficient incorporation of unnatural amino acids in yeast", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 130, no. 19, 22 April 2008 (2008-04-22), pages 6066-6067, XP002571646, ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/JA800894N [retrieved on 2008-04-22]

LISE MARIE GRAV ET AL: "One-step generation of triple knockout CHO cell lines using CRISPR/Cas9 and fluorescent enrichment", BIOTECHNOLOGY JOURNAL, vol. 10, no. 9, 10 April 2015 (2015-04-10) , pages 1446-1456, XP055400346, DE ISSN: 1860-6768, DOI: 10.1002/biot.201500027

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 generering av en cellelinje som har nedsatt apoptose for å innlemme en ikke-naturlig aminosyre i et protein, hvilken fremgangsmåte omfatter å inaktivere ett eller flere målseter eller regioner i en celle, hvor
5 målsetet(ne) eller regionen(e) er et pro-apoptotisk gen involvert i en apoptotisk bane, hvor det pro-apoptotiske gen er valgt fra Bax og Bak, hvor cellen uttrykker et selektorkodonholdig gen av interesse, og hvor cellen omfatter et ortogonalt aminoacyl-tRNA-syntetase (O-RS) og et ortogonalt undertrykker-tRNA (O-tRNA).
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, ytterligere omfattende å tilveiebringe et
10 nukleinsyremolekyl som har evnen til å inaktivere målsetet(ne) eller regionen(e) i cellen, og innføre nukleinsyremolekylet inn i cellen, hvor nukleinsyremolekylet inaktiverer målsetet(ne) eller regionen(e), valgfritt hvor nukleinsyremolekylet er valgt fra SEQ ID NOs: 1-6.
3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller krav 2, hvor:
 - 15 a) cellelinjen er
 - (i) en eukaryotisk cellelinje; og/eller
 - (ii) valgt fra en transient cellelinje, en stabil cellelinjepopulasjon eller en stabil klonal cellelinje, valgfritt hvor den stabile cellelinjepopulasjon er en platformcellelinje eller produksjonscellelinje; eller
 - 20 b) cellelinjen er valgt fra COS, CHO, VERO, MDCK, WI38, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NS0, SP2/0-Ag14, HeLa eller HEK293.
4. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-3, hvor:
 - a) den ikke-naturlige aminosyre er valgt fra para-acetylfenylalanin, *p*-nitrofenylalanin, *p*-sulfotyrosin, *p*-karboksyfenylalanin, *o*-nitrofenylalanin, *m*-
25 nitrofenylalanin, *p*-boronylphenylalanin, *o*-boronylphenylalanin, *m*-boronylphenylalanin, *p*-aminofenylalanin, *o*-aminofenylalanin, *m*-aminofenylalanin, *p*-acylphenylalanin, *o*-acylphenylalanin, *m*-acylphenylalanin, *p*-OMe fenylalanin, *o*-OMe fenylalanin, *m*-OMe fenylalanin, *p*-sulfofenylalanin, *o*-sulfofenylalanin, *m*-sulfofenylalanin, 5-nitro-His, 3-nitro-Tyr, 2-nitro-Tyr, nitro-substituert Leu, nitro-substituert His, nitro-

substituert De, nitro-substituert Trp, 2-nitro-Trp, 4-nitro-Trp, 5-nitro-Trp, 6-nitro-Trp, 7-nitro-Trp, 3-aminotyrosin, 2-aminotyrosin, O-sulfotyrosin, 2-sulfooksyfenylalanin, 3-sulfooksyfenylalanin, o-karboksyfenylalanin, m-karboksyfenylalanin, *p*-acetyl-L-fenylalanin, *p*-propargylfenylalanin, O-metyl-L-tyrosin, L-3-(2-naftyl)alanin, 3-metylphenylalanin, O-4-allyl-L-tyrosin, 4-propyl-L-tyrosin, tri-O-acetyl-GlcNAc β -serin, L-Dopa, fluorert fenylalanin, isopropyl-L-fenylalanin, *p*-azido-L-fenylalanin, *p*-acyl-L-fenylalanin, *p*-benzoyl-L-fenylalanin, L-fosfoserin, fosfonoserin, fosfonotyrosin, *p*-jodfenylalanin, *p*-bromfenylalanin, *p*-amino-L-fenylalanin, isopropyl-L-fenylalanin og *p*-propargyloksy-L-fenylalanin;
 10 og/eller

b) den ikke-naturlige aminosyre er setespesifikt innlemmet i nevnte protein.

5. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-4, hvor genet av interesse er et bioterapeutisk gen eller produkt, valgfritt hvor det bioterapeutiske gen eller produkt er en vaksine.

15 6. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-5, hvor genet av interesse koder for:

a) et antistoff, scFv, scFv-fusjonsprotein, Fc-fusjonsprotein, Faktor VII, Faktor VIII eller Faktor IV;

20 b) et cytokin, interleukin, interferon, kjemokin, vekstfaktor, hormon eller en receptor, analog, bispesifikk eller fragment derav; eller

c) HER2, CD-70, PSMA, 5T4, EGFR, TROP2, CD3, IL-2, IL-3, IL-10, IL-15, GPC3, DLL3, ROR1, leptin, FGF-21, FGF-23, HGH, FcR, insulin, TNFR1, TRAIL, EPO eller en analog, bispesifikk eller fragment derav.

7. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-6, hvor:

25 a) målsetet(ne) eller regionen(e) er fullstendig eller delvis inaktivert;

b) målsetet(ne) eller regionen(e) er like eller forskjellige;

c) selektorkodonet er et nonsens-kodon, et sjeldent kodon, et fire-basers kodon; og/eller

d) selektorkodonet er et okerkodon, et opalkodon eller et ravkodon.

8. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-7, for å optimere utbyttet av et protein som inneholder en ikke-naturlig aminosyre i en cellelinje, valgfritt hvor utbyttet av proteinet som inneholder den ikke-naturlige aminosyre er
5 minst 0,5 ganger større eller mer, enn i fravær av det eller de inaktiverede målsetet(ne) eller regionen(e).

9. Fremgangsmåte for å minske eller redusere apoptose i en celle, hvor cellen uttrykker et selektorkodonholdig gen av interesse, og hvor cellen omfatter et ortogonalt aminoacyl-tRNA-syntetase (O-RS) og et ortogonalt undertrykker-tRNA
10 (O-tRNA), hvilken fremgangsmåte omfatter å inaktivere ett eller flere pro-apoptotisk målseter eller regioner i cellen, hvor the ett eller flere pro-apoptotiske målseter eller regioner valgt fra Bax og Bak.

10. Fremgangsmåte ved generering av en celle eller cellelinje som har nedsatt apoptose for å innlemme en ikke-naturlig aminosyre i et protein, hvilken
15 fremgangsmåte omfatter å: tilveiebringe en celle eller cellelinje som uttrykker et selektorkodonholdig gen av interesse, og omfatter et ortogonalt aminoacyl-tRNA-syntetase (O-RS) og et ortogonalt undertrykker-tRNA (O-tRNA); innføre inn i cellelinjen et nukleinsyremolekyl som har evnen til å inaktivere ett eller flere målseter eller regioner i cellen eller cellelinje, hvor målsetet(ne) eller regionen(e) er
20 et pro-apoptotisk gen involvert i en apoptotisk bane, hvor det pro-apoptotiske gen er valgt fra Bax og Bak; valgfritt hvor nukleinsyremolekylet er valgt fra SEQ ID NOs: 1-6, og ytterligere valgfritt å tilveiebringe en ikke-naturlig aminosyre til cellen eller cellelinje.

11. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-10, omfattende å
25 inaktivere både Bax og Bak, og hvor genet av interesse koder for et antistoff.

12. Celle eller cellelinje som har nedsatt apoptose for å innlemme en ikke-naturlig aminosyre i et protein, hvor cellen uttrykker et selektorkodonholdig gen av interesse, hvor cellen omfatter et ortogonalt aminoacyl-tRNA-syntetase (O-RS), og et ortogonalt undertrykker-tRNA (O-tRNA); og hvor cellen omfatter ett eller flere
30 inaktiverede målseter eller regioner, hvor det eller de inaktiverede målsetet(ne) eller regionen(e) er et proapoptotisk gen involvert i en apoptotisk bane, hvor det pro-apoptotiske gen er valgt fra Bax og Bak.

13. Celle eller cellelinje ifølge krav 12, omfattende et nukleinsyremolekyl som har evnen til å inaktivere målsetet(ne) eller regionen(e) i cellen, valgfritt hvor nukleinsyremolekylet er valgt fra SEQ ID NOs: 1-6.
14. Celle eller cellelinje ifølge krav 12 eller krav 13, hvor:
- 5 a) cellen eller cellelinjen er:
- (i) en eukaryotisk cellelinje; og/eller
- (ii) valgt fra en transient cellelinje, en stabil cellelinjepopulasjon eller en stabil klonal cellelinje, valgfritt hvor den stabile cellelinjepopulasjon er en platformcellelinje eller produksjonscellelinje; eller
- 10 b) cellen eller cellelinjen er valgt fra COS, CHO, VERO, MDCK, WI38, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NS0, SP2/0-Ag14, HeLa eller HEK293; og/eller
- c) selektorkodonet er:
- (i) et nonsens-kodon, et sjeldent kodon, et fire-basers kodon; eller
- (ii) et okerkodon, et opalkodon eller et ravkodon.
- 15 15. Celle eller cellelinje ifølge et hvilket som helst av kravene 12-14, hvor genet av interesse er a bioterapeutisk gen eller produkt, valgfritt hvor det bioterapeutiske gen eller produkt er en vaksine.
16. Celle eller cellelinje ifølge et hvilket som helst av kravene 12-15, hvor genet av interesse koder for:
- 20 a) et antistoff, scFv, scFv-fusjonsprotein, Fc fusjonsprotein, Faktor VII, Faktor VIII eller Faktor IV;
- b) et cytokin, interleukin, interferon, kjemokin, vekstfaktor, hormon eller en receptor, analog, bispesifikk eller fragment derav; eller

c) HER2, CD-70, PSMA, 5T4, EGFR, TROP2, CD3, IL-2, IL-3, IL-10, IL-15, GPC3, DLL3, ROR1, leptin, FGF-21, FGF-23, HGH, FcR, insulin, TNFR1, TRAIL, EPO eller en analog, bispesifikk eller fragment derav.

17. Celle eller cellelinje ifølge et hvilket som helst av kravene 12-16, hvor både
5 Bax og Bak er inaktivert, og hvor genet av interesse koder for et antistoff.