



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO

(10) Identifikator
dokumenta:



HR P20100011 T1

HR P20100011 T1

(12) **PRIJEVOD PATENTNIH ZAHTEJEVA
EUROPSKOG PATENTA**

(51) MKP:

C12P 21/02 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(46) Datum objave prijevoda patentnih zahtjeva: 28.02.2010.

(21) Broj predmeta: P20100011T

(22) Datum podnošenja zahtjeva u HR: 11.01.2010.

(86) Broj međunarodne prijave: PCT/US2005030439
Datum podnošenja međunarodne prijave: 26.08.2005.

(96) Broj europske prijave patenta: EP 05791482.2
Datum podnošenja europske prijave patenta: 26.08.2005.

(87) Broj međunarodne objave: WO 2006026447
Datum međunarodne objave: 09.03.2006.

(97) Broj objave europske prijave patenta: EP 1781802 A2
Datum objave europske prijave patenta: 09.05.2007.

(97) Broj objave europskog patenta: EP 1781802 B1
Datum objave europskog patenta: 21.10.2009.

(31) Broj prve prijave: 605379 P

(32) Datum podnošenja prve prijave: 27.08.2004.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US

(73) Nositelj patenta:

(72) Izumitelji:

(74) Zastupnik:

Wyeth Research Ireland Ltd., Little Connell, Newbridge, Kildare, IE
Denis Drapeau, 55 Old Farm Road, 03079 Salem, NH, US
Yen-Tung Luan, 3 Armand Drive, 01824 Chelmsford, MA, US
James R. Mercer, 226 Hampstead Road, 03038 Derry, NH, US
Wenge Wang, 1 Hollowridge Road, 01863 North Chelmsford, MA, US
Daniel Lasko, 19 Gleason Street, 02155 Medford, MA, US
KORPER I PARTNERI odvjetničko društvo, odvjetnica DINA KORPER
ŽEMVA, 10000 Zagreb, HR

(54) Naziv izuma:

POSTUPAK ZA PROIZVODNJU TNFR-IG FUZIJSKOG PROTEINA

HR P20100011 T1

PATENTNI ZAHTJEVI

- 5 1. Postupak za proizvodnju fuzijskog proteina receptora faktora nekroze tumora i imunoglobulina (TNFR-Ig) u staničnoj kulturi na veliko, **naznačen time**, što se sastoji od koraka:
dobivanja stanične kulture, koja sadrži:
stanice sisavaca, koje sadrže gen koji kodira TNFR-Ig gen koji se ekspresira u uvjetima stanične kulture; i
medij, koji sadrži glutamin, a ima karakteristike medija koje se biraju iz grupe koju čine: (i) kumulativna količina
10 aminokiselina po jedinici volumena veća od oko 70 mM, (ii) molski odnos kumulativnog glutamina prema kumulativnom asparaginu manji od oko 2, (iii) molski odnos kumulativnog glutamina prema kumulativnim ukupnim aminokiselinama manji od oko 0,2, (iv) molski odnos kumulativnih neorganskih iona prema kumulativnim ukupnim aminokiselinama između oko 0,4 i 1, (v) kombiniranu kumulativnu količinu glutamina i asparagina po jedinici volumena veću od oko 16 mM, i njihove kombinacije;
15 održavanja spomenute kulture u inicijalnoj fazi rasta, pod prvim skupom uvjeta kulture, tijekom prvog perioda vremena, dovoljnog da se dozvoli spomenutim stanicama da se reproduciraju do gustoće vitalnih stanica unutar opsega od oko 20%-80% od maksimalno moguće gustoće vitalnih stanica, kada se spomenuta kultura održava pod prvim skupom uvjeta kulture;
izmjene najmanje jednog uvjeta kulture, tako da se zatim primjenjuje drugi skup uvjeta kulture;
20 održavanja spomenute kulture tijekom drugog perioda vremena pod ovim drugim skupom uvjeta, a u drugom periodu vremena se akumulira TNFR-Ig u staničnoj kulturi.
2. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što spomenuti medij sadrži molski odnos kumulativnog glutamina prema kumulativnom asparaginu koji je manji od oko 2; a
spomenuti medij ima dvije karakteristike medija, koje se biraju iz grupe koju čine: (i) medij sadrži količinu
25 kumulativnih aminokiselina po jedinici volumena veću od oko 70 mM, (iii) molski odnos kumulativnog glutamina prema kumulativnim ukupnim aminokiselinama manji od oko 0,2, (iv) molski odnos kumulativnih neorganskih iona prema kumulativnim ukupnim aminokiselinama između oko 0,4 i 1, (v) kombiniranu kumulativnu količinu glutamina i asparagina po jedinici volumena veću od oko 16 mM, i njihove kombinacije.
3. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što se spomenuti uvjet stanične kulture, u spomenutom koraku promjene najmanje jednog uvjeta kulture, bira iz grupe koju čine: (i) temperatura, (ii) pH, (iii) osmolalnost, (iv) sadržaj kemijskog induktanta, i njihove kombinacije.
4. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što je inicijalna koncentracija glutamina u spomenutom mediju manja od ili jednaka 10 mM.
5. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što je inicijalna koncentracija glutamina u spomenutom mediju manja od ili jednaka 4 mM.
35
6. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što je ukupna kumulativna količina glutamina po jedinici volumena u spomenutom mediju manja ili jednaka 10 mM.
7. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što je ukupna kumulativna količina glutamina po jedinici volumena u spomenutom mediju manja ili jednaka 4 mM.
- 40 8. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što se glutamin osigurava samo u inicijalnom mediju, u polaznoj staničnoj kulturi.
9. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što je inicijalna gustoća spomenutih stanica sisavaca najmanje 2×10^5 stanica/mL.
10. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što je inicijalna gustoća spomenutih stanica sisavaca najmanje 2×10^6 stanica/mL.
45
11. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što korak osiguravanja sadrži osiguravanje najmanje oko 1000 L kulture.
12. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što korak osiguravanja sadrži osiguravanje najmanje oko 10.000 L kulture.
- 50 13. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što spomenuti prvi skup uvjeta sadrži prvi opseg temperature, koji je približno od 30°C do 42°C.
14. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što spomenuti prvi skup uvjeta sadrži prvi opseg temperature koji je približno 37°C.
15. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što spomenuti prvi skup uvjeta sadrži drugi opseg temperature, koji je približno od 25°C do 41°C.
55
16. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što spomenuti prvi skup uvjeta sadrži drugi opseg temperature, koji je približno od 29°C do 35°C.
17. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što spomenuti prvi skup uvjeta sadrži drugi opseg temperature, koji je približno 31°C.
- 60 18. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što sadrži još i drugi korak izmjene, poslije spomenute prve izmjene najmanje jednog od uvjeta kulture, a koji se sastoji od izmjene najmanje jednog od uvjeta kulture, tako da se u kulturi primjenjuje treći skup uvjeta.

19. Postupak prema Zahtjevu 18, **naznačen time**, što drugi korak izmjene sadrži izmjenu najmanje jednog od uvjeta kulture, koji se bira iz grupe koju čine: (i) temperatura, (ii) pH, (iii) osmolalnost, (iv) sadržaj kemijskog induktanta, i njihove kombinacije.
20. Postupak prema Zahtjevu 18, **naznačen time**, što spomenuti treći skup uvjeta sadrži treći opseg temperature, koji je približno od 27 do 37°C.
21. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što spomenuti prvi period vremena traje između 1 i 7 dana.
22. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što spomenuti prvi period vremena traje približno 4 dana.
23. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što spomenuti prvi period vremena i spomenuti drugi period vremena traju najmanje 5 dana.
24. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što u koraku održavanja spomenute kulture u drugom periodu vremena, sadržaj laktata opada, poslije dostizanja maksimalnog sadržaja laktata u kulturi.
25. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što u koraku održavanja spomenute kulture u drugom periodu vremena, sadržaj amonija opada, poslije dostizanja maksimalnog sadržaja amonija u kulturi.
26. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što je spomenuta količina dobivenog TNFR-Ig najmanje 1,5-put veća nego količina dobivenog TNFR-Ig pod inače identičnim uvjetima, u inače identičnom mediju, kojem nedostaju spomenute karakteristike medija.
27. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što je spomenuta ukupna količina dobivenog TNFR-Ig najmanje 2-puta veća nego količina dobivenog TNFR-Ig pod inače identičnim uvjetima, u inače identičnom mediju, kojem nedostaju spomenute karakteristike medija.
28. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što se spomenuta stanična kultura osigurava još i komponentama suplemenata.
29. Postupak prema Zahtjevu 28, **naznačen time**, što se spomenute komponente suplemenata osiguravaju u više intervala.
30. Postupak prema Zahtjevu 28, **naznačen time**, što se spomenute komponente suplemenata biraju iz grupe koju čine hormoni i/ili drugi faktori rasta, određeni ioni (kao što su natrijev, kloridni, kalcijev, magnezijev i fosfatni), puferi, vitamini, nukleozidi ili nukleotidi, mikroelementi (neorganski spojevi obično prisutni u vrlo niskim konačnim koncentracijama), aminokiseline, lipidi, ili glukoza ili neki drugi izvor energije.
31. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što se spomenutoj kulturi ne dodaju komponente suplemenata tijekom trajanja proizvodnje spomenutog TNFR-Ig.
32. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što se u spomenutoj kulturi glutamin zamjenjuje glicilglutaminom.
33. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što je spomenuta kumulativna ukupna količina histidina, izoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptofana i tirozina po jedinici volumena u spomenutom mediju veća od približno 25 mM.
34. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što je spomenuta kumulativna ukupna količina histidina, izoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptofana i tirozina po jedinici volumena u spomenutom mediju veća od približno 35 mM.
35. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što spomenuti medij ima karakteristike medija koje se biraju iz grupe koju čine:
 - (i) kumulativna ukupna količina histidina po jedinici volumena veća od približno 1,7 mM;
 - (ii) kumulativna ukupna količina izoleucina po jedinici volumena veća od približno 3,5 mM;
 - (iii) kumulativna ukupna količina leucina po jedinici volumena veća od približno 5,5 mM;
 - (iv) kumulativna ukupna količina metionina po jedinici volumena veća od približno 2,0 mM;
 - (v) kumulativna ukupna količina fenilalanina po jedinici volumena veća od približno 2,5 mM;
 - (vi) kumulativna ukupna količina prolina po jedinici volumena veća od približno 2,5 mM;
 - (vii) kumulativna ukupna količina triptofana po jedinici volumena veća od približno 1,0 mM;
 - (viii) kumulativna ukupna količina tirozina po jedinici volumena veća od približno 2,0 mM.
36. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što je kumulativna ukupna količina serina po jedinici volumena u spomenutom mediju veća od približno 10 mM.
37. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što je kumulativna ukupna količina asparagina po jedinici volumena u spomenutom mediju veća od približno 8 mM.
38. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što je kumulativna ukupna količina asparagina po jedinici volumena u spomenutom mediju veća od približno 12 mM.
39. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što je kumulativna ukupna količina fosfora po jedinici volumena u spomenutom mediju veća od približno 5 mM.
40. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što je kumulativna ukupna količina glutamata po jedinici volumena u spomenutom mediju manja od približno 1 mM.
41. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što je kumulativna ukupna količina kalcij pantotenata po jedinici volumena u spomenutom mediju veća od približno 20 mg/L.
42. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što je kumulativna ukupna količina nikotinamida po jedinici volumena u spomenutom mediju veća od približno 25 mg/L.
43. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što je kumulativna ukupna količina piridoksina i piridoksala po jedinici volumena u spomenutom mediju veća od približno 35 mg/L.

44. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što je kumulativna ukupna količina riboflavina po jedinici volumena u spomenutom mediju veća od približno 2,0 mg/L.
45. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što je kumulativna ukupna količina tiamin hidroklorida po jedinici volumena u spomenutom mediju veća od približno 35 mg/L.
- 5 46. Postupak prema Zahtjevu 1, **naznačen time**, što se spomenuti medij sastoji od medija koji sadrži glutamin i ima karakteristike medija koje se biraju iz grupe koju čine:
- (i) polazna koncentracija aminokiselina veća od oko 70 mM,
 - (ii) molski odnos polaznog glutamina prema polaznom asparaginu manji od oko 2,
 - (iii) molski odnos polaznog glutamina prema polaznim ukupnim aminokiselinama manji od oko 0,2,
 - 10 (iv) molski odnos polaznih neorganskih iona prema polaznim ukupnim aminokiselinama između oko 0,4 i 1,
 - (v) polazna koncentracija kombiniranih glutamina i asparagina veća od oko 16 mM, i njihove kombinacije:
47. Postupak za proizvodnju TNFR-Ig na velikoj skali proizvodnje stanica iz kulture, **naznačen time**, što sadrži korake: dobivanja stanične kulture, koja sadrži:
- stanice sisavaca, koje sadrže gen koji kodira TNFR-Ig gen, gen koji se ekspresira u uvjetima stanične kulture; i
 - 15 definirani medij, koji sadrži glutamin, a ima najmanje dvije karakteristike medija koje se biraju iz grupe koju čine:
 - (i) polazna koncentracija aminokiselina veća od oko 70 mM,
 - (ii) molski odnos glutamina prema asparaginu manji od oko 2,
 - (iii) molski odnos glutamina prema ukupnim aminokiselinama manji od oko 0,2,
 - 20 (iv) molski odnos neorganskih iona prema ukupnim aminokiselinama između oko 0,4 i 1,
 - (v) kombiniranu koncentraciju glutamina i asparagina veću od oko 16 mM;
- održavanja spomenute kulture u inicijalnoj fazi rasta pod prvim skupom uvjeta kulture, tijekom prvog perioda vremena, dovoljno da se dozvoli spomenutim stanicama da se reproduciraju unutar opsega od oko 20%-80% od maksimalno moguće gustoće vitalnih stanica, ako se spomenuta kultura održava pod prvim skupom uvjeta kulture;
- 25 izmjene najmanje jednog uvjeta kulture, tako da se primjenjuje drugi skup uvjeta kulture;
- održavanja spomenute kulture tijekom drugog perioda vremena pod ovim drugim skupom uvjeta, a u ovom drugom periodu vremena u staničnoj kulturi se akumulira TNFR-Ig.
48. Postupak prema Zahtjevu 47, **naznačen time**, što spomenuti medij ima karakteristike medija:
- i) polaznu koncentraciju aminokiselina veću od oko 70 mM,
 - 30 ii) molski odnos glutamina prema asparaginu manji od oko 2,
 - iii) molski odnos glutamina prema ukupnim aminokiselinama manji od oko 0,2,
 - iv) molski odnos neorganskih iona prema ukupnim aminokiselinama između oko 0,4 i 1, i
 - v) kombiniranu koncentraciju glutamina i asparagina veću od oko 16 mM.
49. Postupak prema bilo kojem od Zahtjeva 1-2, ili 46-48, **naznačen time**, što su:
- 35 sadržaji laktata niži od sadržaja koji su opaženi pod inače identičnim uvjetima u inače identičnom mediju, kojem nedostaju spomenute karakteristike;
- sadržaji amonija niži od sadržaja koji su opaženi pod inače identičnim uvjetima u inače identičnom mediju, kojem nedostaju spomenute karakteristike; i
- 40 ukupna količina proizvedenog TNFR-Ig je bar toliko velika kao što se opaža pod inače identičnim uvjetima u inače identičnom mediju, kojem nedostaju spomenute karakteristike.
50. Postupak prema Zahtjevima 1 do 47, **naznačen time**, što se proizvedeni TNFR-Ig izolira i/ili pročišćava za upotrebu ili za dobivanje farmaceutskih proizvoda.