



(12) Translation of  
European patent specification

(11) NO/EP 2464725 B1

NORWAY

(19) NO  
(51) Int Cl.  
**C12N 5/10 (2006.01)**  
**C12N 5/07 (2010.01)**

**Norwegian Industrial Property Office**

---

(45) Translation Published 2020.06.02

(80) Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent 2020.03.25

(86) European Application Nr. 10745064.5

(86) European Filing Date 2010.08.06

(87) The European Application's Publication Date 2012.06.20

(30) Priority 2009.08.11, US, 232889 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 ; SE ; SI ; SK ; SM ; TR

(73) Proprietor F. Hoffmann-La Roche AG, Grenzacherstraße 124, 4070 Basel, Sveits

(72) Inventor GAWLITZEK, Martin, 1115 Foothill St, Redwood CityCA 94061, USA  
PETRAGLIA, Christina, Teresa, 8163 Briar Oaks Drive, San RamonCA 94582, USA  
LUO, Shun, 37 Bristlecone, IrvineCA 92620, USA

(74) Agent or Attorney PLOUGMANN VINGTOFT, Postboks 1003 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

---

(54) Title **PRODUCTION OF PROTEINS IN GLUTAMINE-FREE CELL CULTURE MEDIA**

(56) References Cited: GB-A- 2 237 288  
WO-A1-2005/083058  
KURANO N ET AL: "Growth behavior of Chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor. 2. Effects of medium components and waste products" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL LNKD- DOI:10.1016/0168-1656(90)90055-G, vol. 15, no. 1-2, 1 July 1990 (1990-07-01) , pages 113-128, XP023944043 ISSN: 0168-1656 [retrieved on 1990-07-01]  
HAIYAN HUANG ET AL: "Nitrogen metabolism of asparagine and glutamate in Vero cells studied by 1H/15N NMR spectroscopy" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE LNKD- DOI:10.1007/S00253-007-1181-8, vol. 77, no. 2, 19 October 2007 (2007-10-19), pages 427-436, XP019560711 ISSN: 1432-0614

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 polypeptid i en pattedyrvertscelle som uttrykker polypeptidet, omfattende å dyrke pattedyrvertscellen under en produksjonsfase av kulturen i et innledningsvis glutaminfritt produksjonskulturmedium tilsatt 10 mM asparagin.
2. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori pattedyrvertscellen er en eggstokkcelle fra kinesisk dverghamster (CHO).
3. Fremgangsmåten ifølge krav 2, hvori pattedyrvertscellen er en dhfr<sup>-</sup>CHO-celle.
4. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori produksjonsmediet er serumfritt.
5. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori produksjonskulturmediet omfatter én eller flere ingredienser valgt fra gruppen som består av
  - 1) en energikilde;
  - 2) essensielle aminosyrer;
  - 3) vitaminer;
  - 4) frie fettsyrer; og
  - 5) sporstoffer.
6. Fremgangsmåten ifølge krav 5, hvori produksjonskulturmediet videre omfatter én eller flere ingredienser valgt fra gruppen som består av:
  - 1) hormoner og andre vekstfaktorer;
  - 2) salter og buffere; og
  - 3) nukleosider.
7. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori produksjonsfasen er en satsvis («batch») eller matet satsvis («fed-batch») dyrkingsfase.
8. Fremgangsmåten ifølge krav 1, videre omfattende trinnet å isolere polypeptidet.
9. Fremgangsmåten ifølge krav 8, videre omfattende å bestemme én eller flere av cellens levedyktighet, kulturens levetid, spesifikk produktivitet og endelig rekombinant proteintiter etter isoleringen.
10. Fremgangsmåten ifølge krav 9, hvori minst én av cellens levedyktighet, kulturens levetid, spesifikk produktivitet og endelig rekombinant proteintiter økes i forhold til det samme polypeptidet produsert i et glutaminholdig produksjonsmedium med samme sammensetning.

11. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori polypeptidet er et glykoprotein fra pattedyr.
12. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori polypeptidet velges fra gruppen som består av antistoffer, antistoffragmenter og immunadhesiner.
13. Fremgangsmåten ifølge krav 12, hvori antistoffragmentet velges fra gruppen som består av Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, (scFv)<sub>2</sub>, dAb, fragmenter av komplementaritetsbestemmende region (CDR), lineære antistoffer, enkeltkjedeantistoffmolekyler, minibodies, diabodies og multispesifikke antistoffer dannet av antistoffragmenter.
14. Fremgangsmåten ifølge krav 12, hvori antistoffet eller antistoffragmentet er kimært, humanisert eller humant.
15. Fremgangsmåten ifølge krav 12, hvori antistoffet eller antistoffragmentet er et terapeutisk antistoff eller et biologisk funksjonelt fragment derav.
16. Fremgangsmåten ifølge krav 15, hvori det terapeutiske antistoffet velges fra gruppen som består av anti-HER2; antistoffene antistoffer mot CD20; antistoffer mot IL-8; antistoffer mot VEGF; antistoffer mot CD40, antistoffer mot CD11a; antistoffer mot CD18; antistoffer mot IgE; antistoffer mot Apo-2-reseptor; antistoffer mot vevsfaktorer (TF); antistoffer mot humant  $\alpha\beta 7$ -integrin; antistoffer mot EGFR; antistoffer mot CD3; antistoffer mot CD25; antistoffer mot CD4; antistoffer mot CD52; antistoffer mot Fc-reseptorer; antistoffer mot karsinoembryoniske antigener (CEA); antistoffer mot brystepitelceller; antistoffer som binder seg til tykktarmskarsinomceller; antistoffer mot CD38; antistoffer mot CD33; antistoffer mot CD22; antistoffer mot EpCAM; antistoffer mot GpIIb / IIIa; antistoffer mot RSV; antistoffer mot CMV; antistoffer mot HIV; antistoffer mot hepatitt; antistoffer mot CA 125; antistoffer mot  $\alpha v\beta 3$ ; antistoffer mot humane nyrecellekarsinomer; antistoffer mot humant 17-1A; antistoffer mot humane kolorektale tumorer; antistoff R24 mot humant melanom rettet mot GD3-gangliosid; antistoffer mot humant plateepitelkarsinom; og antistoffer mot humant leukocytantigen (HLA), og antistoffer mot HLA DR.
17. Fremgangsmåten ifølge krav 15, hvori det terapeutiske antistoffet er et antistoff som bindes til en HER-reseptor, VEGF, IgE, CD20, CD11a, CD40, BR3 eller DR5.
18. Fremgangsmåten ifølge krav 17, hvori HER-reseptoren er HER1 og/eller

HER2.

19. Fremgangsmåten ifølge krav 18, hvori HER-reseptoren er HER2.
20. Fremgangsmåten ifølge krav 19, hvori det terapeutiske antistoffet omfatter en tung og/eller lettkjedevariabel domenesekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 16, 17, 18 og 19.
21. Fremgangsmåten ifølge krav 17, hvori det terapeutiske antistoffet er et antistoff som binder seg til CD20.
22. Fremgangsmåten ifølge krav 18, hvori det terapeutiske antistoffet omfatter en tung og/eller lettkjedevariabel domenesekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 1 til 15.
23. Fremgangsmåten ifølge krav 17, hvori det terapeutiske antistoffet er et antistoff som binder seg til VEGF.
24. Fremgangsmåten ifølge krav 23, hvori det terapeutiske antistoffet omfatter en tung og/eller lettkjedevariabel domenesekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 20 til 25.
25. Fremgangsmåten ifølge krav 17, hvori det terapeutiske antistoffet er et antistoff som binder CD11a.
26. Fremgangsmåten ifølge krav 25, hvori det terapeutiske antistoffet omfatter en tung og/eller lettkjedevariabel domenesekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 26 til 29.
27. Fremgangsmåten ifølge krav 17, hvori det terapeutiske antistoffet binder seg til en DR5-reseptor.
28. Fremgangsmåten ifølge krav 27, hvori det terapeutiske antistoffet velges fra gruppen som består av apomab 1.1, 2.1, 3.1, 4.1, 5.1, 5.2, 5.3, 6.1, 6.2, 6.3, 7.1, 7.2, 7.3, 8.1, 8.3, 9.1, 1.2, 2.2, 3.2, 4.2, 5.2, 6.2, 7.2, 8.2, 9.2, 1.3, 2.2, 3.3, 4.3, 5.3, 6.3, 7.3, 8.3, 9.3 og 25.3.
29. Fremgangsmåten ifølge krav 27, hvori det terapeutiske antistoffet er apomab 8.3 eller apomab 7.3.
30. Fremgangsmåten ifølge krav 29, hvori det terapeutiske antistoffet er apomab 7.3.
31. Fremgangsmåten ifølge krav 17, hvori det terapeutiske antistoffet er et antistoff mot BR3 eller BR3-Fc-immunadhesin.
32. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori polypeptidet er et terapeutisk polypeptid.

33. Fremgangsmåten ifølge krav 32, hvori det terapeutiske polypeptidet velges fra gruppen som består av et veksthormon, inkludert humant veksthormon og bovint veksthormon; veksthormonfrigjørende faktor; parathyreoideahormon; thyreoideastimulerende hormon; lipoproteiner; alfa-1-antitrypsin; insulin A-kjede; insulin B-kjede; proinsulin; follikkelstimulerende hormon; kalsitonin; luteiniserende hormon; glukagon; koagulasjonsfaktorer som faktor VIIIC, faktor IX, vevsfaktor og von Willebrands-faktor; antikoagulerende faktorer som protein C; atriatriuretisk faktor; lungesurfaktant; en plasminogenaktivator som urokinase eller human urin eller vevstypeplasminogenaktivator (t-PA); bombesin; trombin; hemopoetisk vekstfaktor; tumornekrosefaktor alfa og beta; enkefalinase; RANTES (regulert ved aktivering, normalt T-celleuttrykt og -utskilt); humant inflammatorisk makrofagprotein (MIP-1-alfa); et serumalbumin som humant serumalbumin; Müller-hemmende stoff; A-kjede fra relaksin; B-kjede fra relaksin; prorelaksin; murint gonadotropinforbundet peptid; et mikrobeprotein som beta-laktamase; DNase; IgE; et cytotoxisk T-lymfocytforbundet antigen (CTLA), som CTLA-4; inhibin; aktivin; vaskulær endotelvekstfaktor (VEGF); reseptorer for hormoner eller vekstfaktorer; protein A eller D; revmatoidfaktorer; en nevrotrofisk faktor som nevrotrof faktor fra bein (BDNF), nevrotrofin-3, -4, -5 eller -6 (NT-3, NT-4, NT-5 eller NT-6), eller en nervevekstfaktor som NGF- $\beta$ ; vekstfaktor fra blodplater (PDGF); fibroblastvekstfaktor som aFGF og bFGF; epidermal vekstfaktor (EGF); transformerende vekstfaktor (TGF) som TGF-alfa og TGF-beta, inkludert TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, TGF- $\beta$ 4 eller TGF- $\beta$ 5; insulinlignende vekstfaktor-I og -II (IGF-I og IGF-II); des(1-3)-IGF-I (hjerne-IGF-I), insulinlignende vekstfaktorbindende proteiner; CD-proteiner som CD3, CD4, CD8, CD 19, CD20, CD34 og CD40; erythropoetin; osteoinduktive faktorer; immuntoksiner; et beinmorfogeneseprotein (BMP); et interferon som alfa-, beta- og gamma-interferon; kolonistimulerende faktorer (CSF-er), f.eks. M-CSF, GM-CSF og G-CSF; interleukiner (IL-er), f.eks. IL-1 til IL-10; superoksid-dismutase; T-cellerreseptorer; overflatemembranproteiner; nedbrytingsakselererende faktor; viralt antigen som for eksempel en del av HIV-kappen; transportproteiner; målsøkingsreseptorer («homing receptors»); addressiner; regulatoriske proteiner; integriner som CD11a, CD11b, CD11c, CD18, en ICAM, VLA-4 og VCAM; et tumorforbundet antigen som HER2-,

HER3- eller HER4-reseptor; samt fragmenter av disse polypeptidene.

34. Bruksklart glutaminfritt cellekulturmedium for fremstillingen av et polypeptid i en produksjonsfase, hvori mediet omfatter asparagin i en konsentrasjon på 10 mM.