



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2970876 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 5/00 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2018.10.15
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2018.07.11
(86)	European Application Nr.	14723561.8
(86)	European Filing Date	2014.03.14
(87)	The European Application's Publication Date	2016.01.20
(30)	Priority	2013.03.15, US, 201361790136 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
	Designated Extension States:	BA ME
(73)	Proprietor	Regeneron Pharmaceuticals, Inc., 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591, US-USA
(72)	Inventor	OSHODI, Shadia, c/o Regeneron Pharmaceuticals, Inc. 777 Old Saw Mill River Road Building 6, Room 63-134, Astoria, New York, NY 11102, US-USA JOHNSON, Amy, 953 Long Hill Road, Briarcliff Manor, NY 10510, US-USA LAWRENCE, Shawn, 371 Kings Highway, Valley Cottage, NY 10989, US-USA
(74)	Agent or Attorney	ZACCO NORWAY AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54) Title **SERUM-FREE CELL CULTURE MEDIUM**

(56) References Cited: WO-A2-2007/077217, US-A1- 2011 229 933, HOLT TA E ET AL: "Polyamine dependence of Chinese hamster ovary cells in serum-free culture is due to deficient arginase activity", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR CELL RESEARCH, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 721, no. 4, 30 December 1982 (1982-12-30), pages 321-327, XP025221778, ISSN: 0167-4889, DOI: 10.1016/0167-4889(82)90085-4 [retrieved on 1982-12-30], HAWEL L ET AL: "Selective putrescine export is regulated by insulin and ornithine in Reuber H35 hepatoma cells", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR CELL RESEARCH, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 1222, no. 1, 26 May 1994 (1994-05-26), pages 15-26, XP023788723, ISSN: 0167-4889, DOI: 10.1016/0167-4889(94)90020-5 [retrieved on 1994-05-26], EP-A1- 1 321 515, US-A1- 2010 285 533, US-A1- 2012 034 674, IGARASHI K ET AL: "Modulation of cellular function by polyamines", INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 42, no. 1, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 39-51, XP026909603, ISSN: 1357-2725, DOI: 10.1016/J.BIOCEL.2009.07.009 [retrieved on 2009-07-28]

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. Cellekulturmedium, som er serumfritt, som omfatter $\geq 0,09 \text{ mM} \pm 0,014 \text{ mM}$ ornitin og $\geq 0,20 \pm 0,03 \text{ mM}$ putrescin.
2. Cellekulturmediet ifølge krav 1 som omfatter $0,3 \pm 0,05 \text{ mM}$ til $0,9 \pm 0,14 \text{ mM}$ ornitin.
5
3. Cellekulturmediet ifølge ett av kravene 1 og 2 som omfatter:
 - (a) ornitin ved $0,6 \pm 0,09 \text{ mM}$; og/eller
 - (b) putrescin ved $0,714 \pm 0,11 \text{ mM}$.
4. Cellekulturmediet ifølge ett av de foregående kravene, hvori:
 - 10 (a) mediet er hydrolysatfritt eller er kjemisk definert;
 - (b) mediet omfatter $\geq 40 \pm 6 \text{ mM}$ av en blanding av aminosyrer eller salter derav, fortrinnsvis hvori blandingen av aminosyrer består av alanin, arginin, asparagin, asparaginsyre, cystein, glutaminsyre, glysin, histidin, isoleucin, leucin, lysin, metionin, fenylalanin, prolin, serin, treonin, tryptofan, tyrosin og valin;
 - 15 (c) mediet omfatter en eller flere fettsyrer, fortrinnsvis hvori den ene eller flere fettsyrene er valgt fra gruppen som består av linolsyre, linolensyre, liponsyre, oljesyre, palmitinsyre, stearinsyre, arakidsyre, arakidonsyre, laurinsyre, behensyre, dekansyre, dodekansyre, heksansyre, lignosersyre, myristinsyre og oktansyre;
 - (d) mediet omfatter en blanding av nukleosider, fortrinnsvis hvori blandingen av
20 nukleosider omfatter en eller flere av adenosin, guanosen, cytidin, uridin, tymidin og hypoksantin;
 - (e) mediet omfatter adenosin, guanosen, cytidin, uridin, tymidin og hypoksantin;
 - (f) mediet omfatter en eller flere divalente kationer, fortrinnsvis hvori det divalente kationet er magnesium, kalsium eller begge deler; og/eller
 - 25 (g) kulturmediet omfatter Ca^{2+} og Mg^{2+} .

5. Fremgangsmåte for dyrking av celler, som omfatter trinnene: (a) å tilveiebringe et cellekulturmedium ifølge ett av de foregående kravene, og (b) å forplante eller vedlikeholde en celle i cellekulturmediet for å danne en cellekultur.

6. Fremgangsmåten ifølge krav 5, hvori:

- 5 (a) cellen er valgt fra gruppen som består av pattedyrcelle, aviærcelle, insektcelle, bakteriecelle og gjærceelle, fortrinnsvis hvori cellen er en CHO-celle; og/eller
- (b) cellen uttrykker et protein av interesse.

7. Fremgangsmåten ifølge krav 6, hvori cellen uttrykker et protein av interesse der:

- (a) proteinet av interesse er et antigenbindende protein;
- 10 (b) proteinet av interesse omfatter et FC-domene; og/eller
- (c) proteinet av interesse er et reseptor-Fc-fusjonsprotein, fortrinnsvis hvori reseptor-Fc-fusjonsprotein er et felleprotein.

8. Fremgangsmåten ifølge krav 7, hvori proteinet av interesse er et reseptor-Fc-fusjonsprotein som er et felleprotein der felleprotein er en IL-1-antagonist eller en

15 VEGF-antagonist.

9. Fremgangsmåten ifølge krav 6, hvori proteinet av interesse er et antistoff eller et antistoffragment, fortrinnsvis hvori antistoffet eller antistoffragmentet er et rekombinant humant antistoff eller fragment derav.

10. Fremgangsmåten ifølge ett av kravene 5 til 9, hvori:

- 20 (a) cellene har en gjennomsnittlig doblingstid på ≤ 30 timer;
- (b) cellene har en gjennomsnittlig doblingstid på ≤ 24 timer;
- (c) cellene har en gjennomsnittlig doblingstid som er minst en tredjedel av cellene dyrket i et cellekulturmedium som inneholder $< 0,3 \pm 0,045$ mM ornitin og $< 0,2 \pm 0,03$ mM putrescin;
- 25 (d) cellekulturen er i stand til å oppnå en levedyktig celletetthet som er minst 15 % større enn en lignende cellekultur i medier som inneholder $< 0,09 \pm 0,014$ mM ornitin og $< 0,2 \pm 0,03$ mM putrescin;

(e) cellekulturen er i stand til å oppnå en levedyktig celletalletthet som er minst 3 ganger større enn en lignende cellekultur i et tilsvarende cellekulturmedium som inneholder $< 0,09 \pm 0,014$ mM ornitin og $< 0,2 \pm 0,03$ mM putrescin; og/eller

(f) fremgangsmåten omfatter trinnet å tilsette en eller flere brukstilsetninger til
5 cellekulturmediet, fortrinnsvis hvori brukstilsetningene omfatter en av flere av NaHCO₃, glutamin, insulin, glukose, CuSO₄, ZnSO₄, FeCl₃, NiSO₄, Na₄EDTA, og Na₃-citrat og/eller hver av NaHCO₃, glutamin, insulin, glukose, CuSO₄, ZnSO₄, FeCl₃, NiSO₄, Na₄ EDTA, og Na₃-citrat tilsettes til mediet som brukstilsetninger.

11. Fremgangsmåte for fremstilling av et protein som omfatter trinnene:

10 (a) å innføre en nukleinsyre inn i en celle som omfatter en sekvens som koder for et protein av interesse;

(b) å velge en celle som bærer nukleinsyren;

(c) å dyrke den valgte cellen i et cellekulturmedium ifølge ett av kravene 1-4 eller ifølge fremgangsmåten ifølge ett av kravene 5-10; og

15 (d) å uttrykke proteinet av interesse i cellen, hvori proteinet av interesse skilles ut i mediet.

12. Fremgangsmåten ifølge krav 11, hvori cellen er en CHO-celle, 293-celle eller BHK-celle.

13. Fremgangsmåten ifølge krav 11 eller 12, hvori:

20 (a) proteinet av interesse er et antigenbindende protein;

(b) proteinet av interesse omfatter et FC-domene; og/eller

(c) proteinet av interesse er valgt fra gruppen som består av reseptor-Fc-fusjonsprotein (TRAP), oppløselig TCR-Fc-fusjonsprotein, antistoff, Fc-fusjonsprotein og ScFv-protein.

25 **14.** Fremgangsmåten ifølge ett av kravene 11 til 14, hvori:

(a) proteinet av interesse fremstilles ved en gjennomsnittlig 7-dagers titer som er minst 7 % større enn den gjennomsnittlige 7-dagers titeren fremstilt av en lignende celle i et cellekulturmedium som inneholder mindre enn $0,09 \pm 0,014$ mM ornitin og mindre enn $0,2 \pm 0,03$ mM putrescin;

(b) proteinet av interesse fremstilles ved en gjennomsnittlig 7-dagers titer som er minst 14 % større enn den gjennomsnittlige 7-dagers titeren fremstilt av en lignende celle i et cellekulturmedium som inneholder mindre enn $0,09 \pm 0,014$ mM ornitin og mindre enn $0,2 \pm 0,03$ mM putrescin;

- 5 (c) proteinet av interesse fremstilles ved en gjennomsnittlig 7-dagers titer som er minst 80 % større enn den gjennomsnittlige 7-dagers titeren fremstilt av en lignende celle i et cellekulturmedium som inneholder mindre enn $0,09 \pm 0,014$ mM ornitin og mindre enn $0,2 \pm 0,03$ mM putrescin;

- 10 (d) proteinet av interesse fremstilles ved en gjennomsnittlig 7-dagers titer som er minst 2 ganger større enn den gjennomsnittlige 7-dagers titeren fremstilt av en lignende celle i et cellekulturmedium som inneholder mindre enn $0,09 \pm 0,014$ mM ornitin og mindre enn $0,2 \pm 0,03$ mM putrescin; og/eller

- 15 (e) proteinet av interesse fremstilles ved en gjennomsnittlig 7-dagers titer som er minst 3 ganger større enn den gjennomsnittlige 7-dagers titeren fremstilt av en lignende celle i et cellekulturmedium som inneholder mindre enn $0,09 \pm 0,014$ mM ornitin og mindre enn $0,2 \pm 0,03$ mM putrescin.

15. Fremgangsmåten ifølge ett av kravene 11 til 14, hvori proteinet av interesse er et rekombinant humant antistoff.