



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3055409 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 5/02 (2006.01)
C12N 5/16 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2018.10.01
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2018.04.25
(86)	European Application Nr.	14851841.8
(86)	European Filing Date	2014.10.10
(87)	The European Application's Publication Date	2016.08.17
(30)	Priority	2013.10.11, US, 201361889815 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	Regeneron Pharmaceuticals, Inc., 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591, US-USA
(72)	Inventor	LAWRENCE, Shawn, 371 Kings Highway, Valley Cottage New York 10989, US-USA KIM, Ann, 300 Mamaroneck Ave, No. 434, White Plains, NY 10605, US-USA JOHNSON, Amy, 953 Long Hill Road W, Briarcliff Manor New York 10510, US-USA
(74)	Agent or Attorney	ZACCO NORWAY AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Title	METABOLICALLY OPTIMIZED CELL CULTURE
(56)	References Cited:	US-B2- 8 470 552, BHANU CHANDRA MULUKUTLA ET AL: "On metabolic shift to lactate consumption in fed-batch culture of mammalian cells", METABOLIC ENGINEERING, ACADEMIC PRESS, US, vol. 14, no. 2, 16 December 2011 (2011-12-16), pages 138-149, XP028466094, ISSN: 1096-7176, DOI: 10.1016/J.YMBEN.2011.12.006 [retrieved on 2012-01-08], FRANCESCA ZAGARI ET AL: "Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity", NEW BIOTECHNOLOGY, vol. 30, no. 2, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 238-245, XP055295213, NL ISSN: 1871-6784, DOI: 10.1016/j.nbt.2012.05.021, JAMEY D YOUNG: "Metabolic flux rewiring in mammalian cell cultures", CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY., vol. 24, no. 6, 28 May 2013 (2013-05-28), pages 1108-1115, XP055295214, GB ISSN: 0958-1669, DOI: 10.1016/j.copbio.2013.04.016, MA, N. ET AL.: 'A single nutrient feed supports both chemically defined NSO and CHO fed-batch processes: improved productivity and lactate metabolism' BIOTECHNOLOGY PROGRESS vol. 25, no. 5, 2009, pages 1353 - 1363, XP055287324, FENG LI ET AL: "Cell culture processes for monoclonal antibody production", MABS, vol. 2, no. 5, 1 September 2010 (2010-09-01), pages 466-479, XP055166177, ISSN: 1942-0862, DOI: 10.4161/mabs.2.5.12720, LE, H. ET AL.: 'Multivariate analysis of cell culture bioprocess data - lactate consumption as process indicator'

JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY vol. 162, no. 2-3, 2012, pages 210 - 223, XP055287323, SHEIKHOLESLAMI, Z. ET AL.: 'The impact of the timing of induction on the metabolism and productivity of CHO cells in culture' BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL vol. 79, 2013, pages 162 - 171, XP028733030, ZHOU W ET AL: "Fed-batch culture of recombinant NS0 myeloma cells with high monoclonal antibody production", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, WILEY & SONS, HOBOKEN, NJ, US, vol. 55, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 783-792, XP002170348, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19970905)55:5<783::AID-BIT8>3.0.CO;2-7

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/>

5 Patentkrav

1. Fremgangsmåte for dyrking av celler som består av:

- (a) dyrking av celler i en første cellekultur,
- (b) fastslåing av at en metabolsk endring i laktatforbruk er forekommet i den første
cellekulturen, og
- (c) overføring av cellene til en andre cellekultur etter at den metabolske endringen i
laktatforbruk i cellene er forekommet,
hvor i laktatkonsentrasjonen i den andre cellekulturen indikerer netto laktatforbruk.

2. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvor i cellene transfekteres med DNA som koder for et polypeptid av interesse før dyrking av celler i en første cellekultur og omfatter å opprettholde den andre cellekulturen under betingelser som tillater ekspresjon av polypeptidet av interesse, og høsting av polypeptidet av interesse fra den andre cellekulturen.

3. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller 2, hvor i den metabolske endringen i laktatforbruk detekteres ved pH-, laktat- eller basemålinger i den første cellekulturen.

4. Fremgangsmåten ifølge ett av kravene 1-3, hvor i den metabolske endringen i laktatforbruk detekteres etter at pH-en øker i det første cellekulturmediet uten tilsetning av base.

5. Fremgangsmåten ifølge ett av kravene 1-4, hvor i den metabolske endringen forekommer når celler kommer ut fra loggfase eller har nådd stasjonær fase i den første cellekulturen.

6. Fremgangsmåten ifølge ett av kravene 1-5, hvor i den metabolske endringen forekommer når laktatnivåer når et platå i den første cellekulturen.

7. Fremgangsmåten ifølge ett av kravene 1-6, hvor i den metabolske endringen forekommer i den første cellekulturen på eller etter 3 dager med cellevekst i den første cellekulturen.

8. Fremgangsmåten ifølge ett av kravene 1-7, hvor i de overførte cellene har en inokulasjonscelletetthet mellom ca. $0,5 \times 10^6$ celler/ml til ca. $3,0 \times 10^6$ celler/ml i den andre cellekulturen.

9. Fremgangsmåten ifølge ett av kravene 1-8, hvor i trinnet å bestemme den metabolske endringen omfatter:

- (a) måling av pH-en i den første cellekulturen,
- (b) tilsetning av base for å opprettholde pH-en over en forhåndsbestemt nedre grense,

- 5 (c) fastslåing av at pH-en er over den forhåndsbestemte nedre grensen for påfølgende intervaller, og
- (d) opphøring av tilsetningen av base,
- for derved å bestemme at den metabolske endringen i laktatforbruk har forekommet i den første cellekulturen.

10

10. Fremgangsmåten ifølge ett av kravene 1-9, hvori den første cellekulturen er en frøtogkultur.

11. Fremgangsmåten ifølge ett av kravene 1-10, hvori den andre cellekulturen er en produksjonskultur.

15

12. Fremgangsmåten ifølge ett av kravene 1-11, hvori overføring av celler til en andre cellekultur omfatter overføring av celler til en produksjonsbioreaktor.

20

13. Fremgangsmåten ifølge ett av kravene 2-12, hvori polypeptidet av interesse er valgt fra gruppen som består av et antistoff, et antigenbindende protein og et fusjonsprotein.

14. Fremgangsmåten ifølge ett av kravene 1-12 hvori én eller flere nukleinsyresekvenser er stabilt integrert inn i det cellulære genomet til cellene, og hvori nukleinsyresekvensene koder for et polypeptid av interesse.

25

15. Fremgangsmåten ifølge ett av kravene 1 eller 3-12, hvori cellene omfatter én eller flere ekspresjonsvektorer som koder for et polypeptid av interesse.

30

16. Fremgangsmåten ifølge krav 14 eller krav 15, hvori polypeptidet av interesse er valgt fra gruppen som består av et antistoff, et antigenbindende protein og et fusjonsprotein.

35

17. Fremgangsmåten ifølge ett av kravene 1-16, hvori cellene er valgt fra gruppen som består av CHO-, COS-, retinal-, Vero-, CV1-, HEK293-, 293 EBNA-, MSR 293-, MDCK-, HaK-, BHK21-, HeLa-, HepG2-, WI38-, MRC 5-, Colo25-, HB 8065-, HL-60-, Jurkat-, Daudi-, A431-, CV-1-, U937-, 3T3-, L-celle, C127-celle, SP2/0-, NS-0-, MMT-, PER.C6-, murine lymfoid- og murine hybridomceller.