



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3351620 B1

NORWAY

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

Norwegian Industrial Property Office

(45) Translation Published 2020.12.14

(80) Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent 2020.09.02

(86) European Application Nr. 18161278.9

(86) European Filing Date 2014.10.10

(87) The European Application's Publication Date 2018.07.25

(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

(62) Divided application EP3055409, 2014.10.10

(73) Proprietor Regeneron Pharmaceuticals, Inc., 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591-6706, USA

(72) Inventor LAWRENCE, Shawn, 371 Kings HighwayValley Cottage, New York, NY 10989, USA
KIM, Ann, 300 Mamaroneck Avenue, No. 434White Plains, New York, NY 10605, USA
JOHNSON, Amy, 953 Long Hill Road WBriarcliff Manor, New York, NY 10510, USA

(74) Agent or Attorney OSLO PATENTKONTOR AS, Hoffsvveien 1A, 0275 OSLO, Norge

(54) Title **METABOLICALLY OPTIMIZED CELL CULTURE**

(56) References Cited: US-B2- 8 470 552
NINGNING MA ET AL: "A single nutrient feed supports both chemically defined NS0 and CHO fed-batch processes: Improved productivity and lactate metabolism", BIOTECHNOLOGY PROGRESS., vol. 25, no. 5, 27 September 2009 (2009-09-27), pages 1353-1363, XP55287324, US ISSN: 8756-7938, DOI: 10.1002/btpr.238
HUONG LE ET AL: "Multivariate analysis of cell culture bioprocess data-Lactate consumption as process indicator", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 162, no. 2-3, 1 December 2012 (2012-12-01), pages 210-223, XP055287323, AMSTERDAM, NL ISSN: 0168-1656, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2012.08.021
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

SHEIKHOESLAMI ZAHRA ET AL: "The impact of the timing of induction on the metabolism and productivity of CHO cells in culture", *BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL*, vol. 79, 8 August 2013 (2013-08-08), pages 162-171, XP028733030, ISSN: 1369-703X, DOI: 10.1016/J.BEJ.2013.07.015

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

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

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

BHANU CHANDRA MULUKUTLA ET AL: "On metabolic shift to lactate consumption in fedbatch 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]

NINGNING MA ET AL: "A single nutrient feed supports both chemically defined NS0 and CHO fed-batch processes: Improved productivity and lactate metabolism", *BIOTECHNOLOGY PROGRESS.*, vol. 25, no. 5, 27 September 2009 (2009-09-27), pages 1353-1363, XP055287324, US ISSN: 8756-7938, DOI: 10.1002/btpr.238

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 protein av interesse omfattende:
 - (a) dyrke celler omfattende en nukleinsyresekvens som koder for et protein av interesse i en første cellekultur;
 - 5 (b) bestemme at et metabolsk skifte i laktatforbruk har forekommet i den første cellekulturen;
 - (c) overføre celler fra den første cellekulturen til en andre cellekultur etter at det metabolske skiftet i laktatforbruk har forekommet;
 - (d) opprettholde den andre cellekulturen i en tidsperiode slik at proteinet
10 av interesse akkumuleres i den andre cellekulturen;
 - (e) høste proteinet av interesse fra den andre cellekulturen; og
 - (f) rense proteinet av interesse.

2. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori laktatkonsentrasjonen i den andre
cellekulturen indikerer netto laktatforbruk.
15

3. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller 2, hvori cellene velges fra gruppen som består av CHO-, COS-, netthinne-, 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-,
20 MMT-, PER.C6-, murine lymfoid- og murine hybridomceller.

4. Fremgangsmåten ifølge krav 3, hvori cellene er CHO-celler.

5. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–4, hvori proteinet
25 av interesse velges fra gruppen som består av et antistoff, antigenbindende protein, fusjonsprotein, Fc-fusjonsprotein og reseptor-Fc-fusjonsprotein.

6. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–5, hvori proteinet
av interesse er et antistoff eller fusjonsprotein.
30

7. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–6, hvori proteinet av interesse fremstilles i den andre cellekulturen ved en titer som er større enn titeren fremstilt i en ellers identisk cellekultur under ellers identiske forhold, bortsett fra at å overføre cellene til den andre cellekulturen skjer før et metabolsk
35 skifte i laktatforbruk har forekommet i den første cellekulturen.

8. Fremgangsmåten ifølge krav 7, hvori proteinet av interesse fremstilles i den andre cellekulturen ved en titer som er minst 2 ganger større enn titeren fremstilt i en ellers identisk cellekultur under ellers identiske forhold, bortsett fra at å overføre cellene til den andre cellekulturen skjer før et metabolsk skifte i laktatforbruk har forekommet i den første cellekulturen.
9. Fremgangsmåten ifølge krav 7, hvori proteinet av interesse fremstilles i den andre cellekulturen ved en titer som er minst 2 ganger, eller 2,5 ganger, 3 ganger, 4 ganger, 5 ganger eller opptil 10 ganger større enn titeren fremstilt i en ellers identisk cellekultur under ellers identiske forhold, bortsett fra at å overføre cellene til den andre cellekulturen skjer før et metabolsk skifte i laktatforbruk har forekommet i den første cellekulturen.
10. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–9, hvori det metabolske skiftet i laktatforbruk detekteres av pH-, laktat- eller basemålinger i den første cellekulturen.
11. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–9, hvori det metabolske skiftet i laktatforbruk detekteres etter at pH-en øker i det første cellekulturmediet uten å tilsette base.
12. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–9, hvori det metabolske skiftet i laktatforbruk detekteres når laktatnivåer når et platå i den første cellekulturen.
13. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–9, hvori trinnet med å bestemme det metabolske skiftet omfatter:
- (a) måle pH i den første cellekulturen,
 - (b) tilsette base for å opprettholde pH-en over en forhåndsbestemt nedre grense,
 - (c) bestemme at pH-en er over den forhåndsbestemte nedre grensen for etterfølgende intervaller, og
 - (d) stoppe tilsetningen av base, og derved bestemme at det metabolske skiftet i laktatforbruk har forekommet i den første cellekulturen.

14. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–13, hvori det metabolske skiftet forekommer i den første cellekulturen på eller etter 3 dager med cellevekst i den første cellekulturen.
- 5 15. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–14, hvori cellene overføres etter at cellene kommer fra log-fasen i den første cellekulturen eller etter at cellene har nådd en stasjonær vekstfase i den første cellekulturen.
- 10 16. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–15, hvori cellene overføres til den andre cellekulturen ved en startcelletetthet på større enn eller lik $0,5 \times 10^6$ celler/ml, eller ved en startcelletetthet mellom $0,5$ - $3,0 \times 10^6$ celler/ml.
- 15 17. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–16, hvori den første cellekulturen er en frøbehandlingskultur.
18. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–17, hvori den andre cellekulturen er en produksjonskultur.
- 20 19. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–18, hvori den første cellekulturen er en frøbehandlingskultur, den andre cellekulturen er en produksjonskultur, og den andre cellekulturen utføres i en annen dyrkingsbeholder enn den første cellekulturen.
- 25 20. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–19, hvori den andre cellekulturen utføres i en produksjonsbioreaktor.
- 30 21. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–20, hvori cellepopulasjonen i den første cellekulturen overføres til den andre cellekulturen slik at den første cellekulturen er en fraksjon av den andre cellekulturen.
22. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–21, hvori nukleinsyresekvensen er stabilt integrert i cellegenomet til cellene.
- 35 23. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–21, hvori cellene omfatter én eller flere vektorer som koder for proteinet av interesse.

24. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–23, hvori det metabolske skiftet i laktatforbruk i den første cellekulturen omfatter et metabolsk skifte i netto laktatforbruk.