



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3612553 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 14/34 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2022.10.10
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2022.06.08
(86)	European Application Nr.	18773868.7
(86)	European Filing Date	2018.04.19
(87)	The European Application's Publication Date	2020.02.26
(30)	Priority	2017.04.22, IN, 201741014335
(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	Biological E Limited, 18/1 & 3 Azamabad, Telangana, Hyderabad 500020, India
(72)	Inventor	MASILAMANI, Balamurali, Biological E Limited 18/1 & 3 Azamabad, Hyderabad Telangana 500020, India SRIRAMAN, Rajan, Biological E Limited 18/1 & 3 Azamabad, Hyderabad Telangana 500020, India DIXIT, Mandar Shirish, Biological E Limited 18/1 & 3 Azamabad, Hyderabad Telangana 500020, India CHAKKA, Deviprasanna, Biological E Limited 18/1 & 3 Azamabad, Hyderabad Telangana 500020, India SUREDDI, Satyam Naidu, Biological E Limited 18/1 & 3 Azamabad, Hyderabad Telangana 500020, India MATUR, Ramesh Venkat, Biological E Limited 18/1 & 3 Azamabad, Hyderabad Telangana 500020, India MANTENA, Narender Dev, Biological E Limited 18/1 & 3 Azamabad, Hyderabad Telangana 500020, India DATLA, Mahima, Biological E Limited 18/1 & 3 Azamabad, Hyderabad Telangana 500020, India
(74)	Agent or Attorney	BRYN AARFLOT AS, Stortingsgata 8, 0161 OSLO, Norge

(54) Title **AN IMPROVED METHOD FOR HIGH LEVEL PRODUCTION OF CRM**

(56) References
Cited: WO-A1-2015/134402, US-A1- 2004 087 020, WO-A1-2013/068568, EP-A2- 0 616 034, WO-A1-2011/123139
NAGARKAR P P ET AL: "The amino acid requirements of Corynebacterium diphtheriae PW 8 substrain CN 2000", JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB, vol. 92, no. 2, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 215-220, XP002446474, ISSN: 1364-5072, DOI: 10.1046/J.1365-2672.2002.01521.X
ZHOU J ET AL: "Secretory expression of recombinant diphtheria toxin mutants in B. Subtilis", JOURNAL OF TONGJI MEDICAL UNIVER, TONGJI MEDICAL UNIVERSITY, WUHAN, CN, vol. 19, no. 4, 1 January 1999 (1999-01-01), pages 253-256, XP009172483, ISSN: 0257-716X, DOI: 10.1007/BF02886955

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.** En forbedret fremgangsmåte for produksjon av CRM₁₉₇ med høyt utbytte ved bruk av konstruert *Corynebacterium diphtheriae* stamme som har økt kopiantall av CRM₁₉₇ gen, hvori fremgangsmåten omfatter dyrking av stammen i et ikke-utsatt fermenteringsmedium som omfatter mer enn 10 aminosyrer andre enn tyrosin og asparagin og er fri for animalske komponenter, hvori ingen maltose brukes som en karbonkilde.
- 2.** Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori fremgangsmåten omfatter å supplere mediet med næringsstoffer.
- 3.** Fremgangsmåten ifølge krav 2, hvori tilskuddet med næringsstoffer er basert på metabolsk fluksmodell.
- 4.** Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori aminosyrene er valgt fra alanin, arginin, asparaginsyre, cystein, glutaminsyre, glutamin, glysin, histidin, isoleucin, leucin, lysin, metionin, fenylalanin, prolin, serin, treonin, Tryptofan, Valin og dets salter.
- 5.** Fremgangsmåte ifølge krav 4, hvori hver aminosyre anvendes i en mengde på 0,05 til 2 g/l.
- 6.** Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori fermenteringsmediet inneholder en kombinasjon av fenylalanin, arginin og andre aminosyrer hvor mengden fenylalanin og arginin er mindre enn 1 g/l.
- 7.** Fremgangsmåten ifølge krav 2, hvori næringsstoffene er valgt fra vitaminer slik som nikotinsyre, tiamin, pantotensyre, biotin, riboflavin, folsyre; pimelinsyre; fosfat, en nitrogenkilde og spormetaller.
- 8.** Fremgangsmåten ifølge hvilket som helst av de foregående kravene, hvori fermenteringsmediet er fullstendig fritt for animalske komponenter.
- 9.** Fremgangsmåten ifølge hvilket som helst av de foregående kravene, hvori fermenteringsmediet omfatter basisfermenteringsmedier omfattende gjærekstrakt, veg.pepton, kaliumdihydrogenfosfat (KH₂PO₄), Tryptofan, Glukose, YC Sporsaltløsning.
- 10.** Fremgangsmåten ifølge hvilket som helst av de foregående kravene, hvori fremgangsmåten omfatter å supplere mediet med glukose under hele fermenteringsprosessen.
- 11.** En forbedret fremgangsmåte for produksjon av CRM₁₉₇ hvori fremgangsmåten omfatter:
 - i) å dyrke den konstruerte *Corynebacterium diphtheriae* stammen som har økt kopiantall av CRM₁₉₇ gen i et ikke-utsatt fermenteringsmedium som er fritt for animalske komponenter og omfatter basismedier og mer enn 10 aminosyrer valgt fra alanin, arginin, asparaginsyre, cystein, glutaminsyre, glutamin, glysin, histidin, isoleucin, leucin, lysin, metionin, fenylalanin, prolin, serin, treonin, tryptofan, valin og dets salter og
 - ii) å supplere mediet med glukose og næringsstoffer basert på metabolsk fluksmodell, der ingen maltose brukes som karbonkilde.
- 12.** En forbedret fremgangsmåte for produksjon av CRM₁₉₇, hvilken fremgangsmåte omfatter dyrking av den konstruerte *Corynebacterium diphtheriae* stamme som har økt kopiantall av CRM₁₉₇ genet i et ikke-utsatt fermenteringsmedium som er fritt for

animalske komponenter og omfatter mer enn 10 andre aminosyrer enn tyrosin og asparagin og supplerer mediet med næringsstoffer basert på metabolsk fluksmodell, der hver aminosyre brukes i en mengde på 0,05 til 2 g/l, hvori ingen maltose brukes som karbonkilde.

13. Fremgangsmåten ifølge hvilket som helst av de foregående kravene, hvori fermenteringen utføres ved en temperatur mellom 30 og 40 °C og ved en pH i området 7,0 til 8,0. fortrinnsvis 7,4 til 7,6

14. Fremgangsmåten ifølge hvilket som helst av de foregående kravene, hvori utbyttet av CRM₁₉₇ oppnådd er mer enn 150 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 500 mg/L.

15. En fremgangsmåte for fremstilling av konjugatvaksine som omfatter konjugering av polysakkarider fra *Salmonella typhi*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* med CRM₁₉₇. fremstilt ifølge hvilket som helst av de foregående kravene.