



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2538968 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 38/46 (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2018.03.26
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2017.11.01
(86)	European Application Nr.	11705806.5
(86)	European Filing Date	2011.02.23
(87)	The European Application's Publication Date	2013.01.02
(30)	Priority	2010.02.24, DK, 201070067 2010.02.24, US, 307587 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	Chiesi Farmaceutici S.p.A., Via Palermo 26/A, 43122 Parma, IT-Italia
(72)	Inventor	FOGH, Jens, Bjergagervej 37, 3540 Lynge, DK-Danmark ANDERSSON, Claes, Tallåsvägen 5, 187 43 Täby, SE-Sverige WEIGELT, Cecilia, Banérgatan 27, 1 tr., 115 22 Stockholm, SE-Sverige HYDÉN, Pia, Dalgången 6, 182 74 Stocksund, SE-Sverige REUTERWALL, Helena, Ripstigen 6, 1 tr., 170 74 Solna, SE-Sverige NILSSON, Stefan, Geijersgatan 35B, 752 31 Uppsala, SE-Sverige
(74)	Agent or Attorney	PLOUGMANN VINGTOFT, Postboks 1003 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

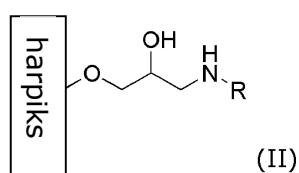
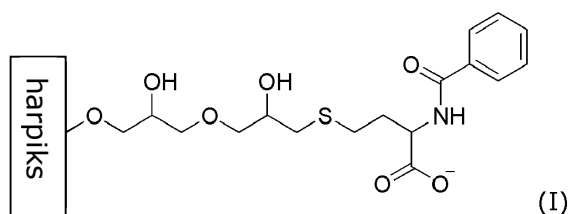
(54)	Title	PROCESS FOR PRODUCTION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT LYSOSOMAL ALPHA-MANNOSIDASE
(56)	References Cited:	WO-A1-2009/007451, WO-A2-2007/112757, US-A1- 2009 191 178, BERG THOMAS ET AL: "Purification and characterization of recombinant human lysosomal alpha-mannosidase", MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 73, no. 1, 24 April 2001 (2001-04-24), pages 18-29, XP002182076, ISSN: 1096-7192, DOI: DOI:10.1006/MGME.2001.3173 cited in the application, WO-A1-2005/094874, GUOFENG ZHAO ET AL: "Ligands for mixed-mode protein chromatography: Principles, characteristics and design", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 144, no. 1, 12 October 2009 (2009-10-12), pages 3-11, XP55000021, ISSN: 0168-1656, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2009.04.009, EP-A1- 1 408 117, WO-A1- 02/15927, WO-A1-2005/073367, FORSEE ET AL: "Purification and characterization of an alpha- 1,2-mannosidase involved in processing asparagine-linked oligosaccharides.", JOURNAL OF

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/>

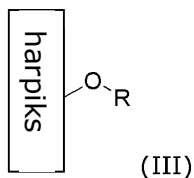
FRAMGANGSMÅTE FOR Å FRAMSTILLE OG RENSE REKOMBINANT LYSOSOMAL ALFA-MANNOSIDASE

P a t e n t k r a v

- 5 **1.** Framgangsmåte for å rense rekombinant human lysosomal alfa-mannosidase fra en cellekultur, hvor en fraksjon av cellekulturen som omfatter rekombinant human lysosomal alfa-mannosidase gjennomgår kromatografi på en harpiks som omfatter en multimodal ligand, hvor den harpiksbundne multimodale liganden er et stoff som har en karboksylsyre- eller sulfonsyregruppe.
- 10 **2.** Framgangsmåte ifølge krav 1, hvor fraksjonen av cellekulturen som omfatter den rekombinante humane lysosomale alfa-mannosidasen er en klart ufortynnet høsting.
- 15 **3.** Framgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1–2, hvor den harpiksbundne multimodale liganden er et stoff på formelen (I), (II) eller (III):

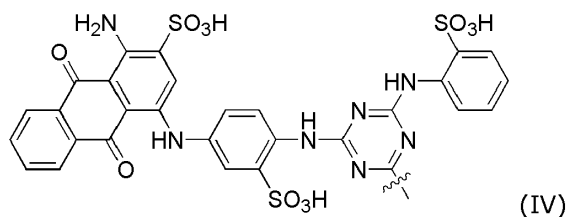


20



hvor R i stoffene på formelen (II) og (III) er en funksjonell gruppe på formelen (IV):

2



4. Framgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1–3, hvor fraksjonen av
5 cellekulturen som lastes på harpiksen som omfatter en multimodal ligand, gjennomgår minst ett vasketrinn med en løsning som omfatter isopropanol.

5. Framgangsmåte ifølge krav 4, hvor løsningen omfatter minst 1 % (vol/vol) isopropanol.

10

6. Framgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1–5, hvor et første eluat som omfatter rekombinant human lysosomal alfa-mannosidase, elueres fra harpiksen som omfatter en multimodal ligand ved hjelp av en vandig løsning som omfatter etylenglykol eller propylenglykol.

15

7. Framgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1–6, hvor et første eluat som omfatter rekombinant human lysosomal alfa-mannosidase hentet fra harpiksen som omfatter en multimodal ligand, videre gjennomgår en framgangsmåte som omfatter trinnene å

20 i) påføre en fraksjon som omfatter rekombinant human lysosomal alfa-mannosidase på en hydrofob-interaksjonskromatografi-harpiks for å tilveiebringe et eluat som omfatter den rekombinante humane lysosomale alfa-mannosidasen,

25 ii) føre en fraksjon som omfatter rekombinant human lysosomal alfa-mannosidase gjennom en blandet-modus-ionebytteharpiks for å muliggjøre retensjon av kontaminasjoner for å tilveiebringe en gjennomstrømning som omfatter den rekombinante humane lysosomale alfa-mannosidasen; og

iii) la en fraksjon som omfatter rekombinant human lysosomal alfa-mannosidase, gjennomgå kromatografi på en anionbytteharpiks for å

tilveiebringe et eluat som omfatter den rekombinante humane lysosomale alfa-mannosidasen.

- 5 **8.** Framgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1–7, hvor den rekombinante humane lysosomale alfa-mannosidasen har en sekvens valgt blant:

A) sekvensen presentert i SEKV ID NR 2

B) en sekvens som har minst 80 % sekvensidentitet med SEKV ID NR 2.

10

- 9.** Sammensetning som omfatter alfa-mannosidase som kan oppnås ved hjelp av renseframgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 7–8.

- 10.** Framgangsmåte for fed-batch- eller kontinuerlig framstilling av rekombinant human lysosomal alfa-mannosidase, som omfatter følgende trinn:

- 15 a. å inokulere en framstillingsreaktor som omfatter et basismedium med celler som er i stand til å framstille rekombinant human lysosomal alfa-mannosidase på dag 0, for å tilveiebringe en cellekultur;
- b. å tilsette et feed-medium til cellekulturen minst én gang fra dag 1;
- 20 c. å justere temperaturen i cellekulturen til maksimalt 35 °C, enten etter dag 3 eller når den levedyktige celletettheten er høyere enn 2,1 MVC/ml, det som inntreffer først.
- d. en renseframgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1–8.

25

- 11.** Framgangsmåte ifølge krav 10, hvor cellekulturen er vesentlig uten tilsetninger som er avledet fra dyr, så som torskelerveroljetilsetninger.

12. Framgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 10–11, hvor framgangsmåten for fed-batch- eller kontinuerlig framstilling utføres på et volum på minst 30 l.

- 5 **13.** Framgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 10–12, hvor den rekombinante humane lysosomale alfa-mannosidasen har en sekvens valgt blant:

A) sekvensen presentert i SEKV ID NR 2

B) en sekvens som har minst 80 % sekvensidentitet med SEKV ID NR 2.

10

14. Framgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 10–13, hvor trinn d) er en renseframgangsmåte som definert i krav 7.

- 15 **15.** Sammensetning som omfatter alfa-mannosidase som kan oppnås ved hjelp av framstillingsframgangsmåte ifølge krav 14.

16. Sammensetning framstilt gjennom framgangsmåte ifølge krav 14 som omfatter rensset rekombinant human lysosomal alfa-mannosidase rensset i henhold til framgangsmåten ifølge kravene 1–8, hvor minst 80 % av alfa-mannosidasen er
20 til stede som et 130 kDa glykoprotein.

17. Sammensetning ifølge krav 16, hvor den rekombinante alfa-mannosidasen forblir stabil i flytende løsning i minst 4 dager når den lagres ved +5 °C eller i minst 24 måneder når den lagres ved –20 °C.

25

18. Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 16–17, hvor alfa-mannosidasen har en sekvens valgt blant:

A) sekvensen presentert i SEKV ID NR 2

B) en sekvens som har minst 80 % sekvensidentitet med SEKV ID NR 2.

30

19. Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 9 og 15–18 til bruk som et legemiddel.

20. Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 9 og 15–18 til bruk i
5 behandlingen av alfa-mannosidose.