



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2595650 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 38/46 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2017.04.03
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2016.11.16
(86)	European Application Nr.	11751689.8
(86)	European Filing Date	2011.07.22
(87)	The European Application's Publication Date	2013.05.29
(30)	Priority	2010.07.22, US, 366714 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	BioMarin Pharmaceutical Inc., 105 Digital Drive, Novato, CA 94949, US-USA
(72)	Inventor	KOPPAKA, Vish, 10 Professional Center Parkway 10, San Rafael, CA 94903, US-USA VELLARD, Michel, Claude, 191 Oak Drive, San Rafael, CA 94901, US-USA OKHAMAFE, Augustus, O., 5310 Crystyl Ranch Drive, Concord, CA 94521, US-USA ARAYA, Kidisti, 2398 Parker Street Apt. 13, Berkeley, CA 94704, US-USA
(74)	Agent or Attorney	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Title	MANUFACTURE OF ACTIVE HIGHLY PHOSPHORYLATED HUMAN N-ACETYL GALACTOSAMINE-6-SULFATASE AND USES THEREOF
(56)	References Cited:	US-A1- 2009 186 011 US-A1- 2010 068 195 ALEXANDER RODRÍGUEZ ET AL: "Enzyme replacement therapy for Morquio A: an active recombinant N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase produced in Escherichia coli BL21", JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY, vol. 37, no. 11, 27 June 2010 (2010-06-27) , pages 1193-1201, XP55018909, ISSN: 1367-5435, DOI: 10.1007/s10295-010-0766-x BIELICKI J ET AL: "EXPRESSION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT HUMAN N-ACETYL GALACTOSAMINE-6-SULPHATASE", BIOCHEMICAL JOURNAL, THE BIOCHEMICAL SOCIETY, LONDON, GB, vol. 33, no. PART 01, 1 October 1995 (1995-10-01), pages 333-339, XP000600743, ISSN: 0264-6021 TOMATSU ET AL: "Characterization and pharmacokinetic study of recombinant human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase", MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 91, no. 1, 10 April 2007 (2007-04-10) , pages 69-78, XP022020286, ISSN: 1096-7192, DOI: 10.1016/J.YMGME.2007.01.004

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 fremgangsmåte for å rense et rekombinant human N-acetylgalaktosamin-6-sulfatase (GALNS)-enzym, nevnte GALNS-enzym som omfatter en aminosyresekvens minst 95 % identisk til aminosyrer 27 til 522 i SEKV ID Nr.: 4, hvor nevnte GALNS-enzym:

har en renhet på minst 95 % som bestemt ved Coomassie Blue-farging når utsatt for SDS-PAGE under ikke-reduserende betingelser,

har minst 50 % ombytting av cysteinresten i posisjon 53 til C_α-formylglysin (FGly), og

har mellom 0,5 til 0,8 bis-fosforylerte oligomannose-kjeder per monomer proteinkjede,

og hvor minst 98 % av nevnte GALNS-enzym er i forløperformen som bestemt ved natriumdodecylsulfat-kapillær-gel-elektroforese (SDS-CGE), som omfatter:

a) filtrering av et dyrkningsmedium som inneholder GALNS-enzymet utskilt fra en pattedyr-cellelinje som uttrykker human sulfatase-modifiserende faktor 1 (SUMF1) og det rekombinante humane GALNS-enzymet, ultrafiltrering av/diafiltrering av det filtrerte dyrkningsmediet, hvorved det ultrafiltrerte/diafiltrerte dyrkningsmediet er konsentrert rundt 20X, og kullfiltrering av det 20X konsentrert ultrafiltrerte/diafiltrerte dyrkningsmediet;

b) lasting av det kullfiltrerte 20X ultrafiltrerte/diafiltrerte dyrkningsmediet fra trinn a) på en Zn-chelaterende Sepharose FF fangst-kolonne, vasking av kolonnen under betingelser slik at GALNS-enzymet holdes tilbake på kolonnen, og eluering av GALNS-enzymet fra kolonnen;

c) filtrering av eluatet fra den Zn-chelaterende Sepharose FF fangst-kolonnen i trinn b) gjennom et filter for å fjerne virus;

d) justering av pH til eluatet fra den Zn-chelaterende Sepharose FF fangst-kolonne-filtratet fra trinn c) til rundt pH 4,5 ± 0,1, og filtrering av det pH 4,5-justerte eluatet fra den Zn-chelaterende Sepharose FF fangst-kolonne-filtratet;

e) lasting av det pH 4,5-justerte filtratet fra den Zn-chelaterende Sepharose FF fangst-kolonnen fra trinn d) på en Fractogel EMD SE Hi-Cap kationebytter-kolonne, vasking av kolonnen under betingelser slik at GALNS-enzymet holdes tilbake på kolonnen, og eluering av GALNS-enzymet fra kolonnen;

f) justering av pH til eluatet fra Fractogel EMD SE Hi-Cap kationebytter-kolonnen fra trinn e) til rundt pH 3,5 ± 0,1 for virusinaktivering;

g) justering av det pH 3,5-virusinaktivert eluatet fra trinn f) til rundt pH 5,0, deretter lasting av det pH 5,0-justerte virusinaktivert eluatet på en ToyoPearl Butyl 650 M polerings-kolonne, vasking av kolonnen under betingelser slik at GALNS-enzymet holdes tilbake på kolonnen, og eluering av GALNS-enzymet fra kolonnen;

h) buffer-bytting av eluatet fra ToyoPearl Butyl 650 M polerings-kolonnen fra trinn g) inn i en formulering som omfatter 20 mM NaOAc/HOAc, 50 mM NaH₂PO₄, 30 mM Arginin HCl, 2 % (vekt/vol) sorbitol, pH 5.4, og justering av konsentrasjonen av GALNS-enzymet i formuleringen til rundt 3 mg/ml;

i) fjerning av eventuelle gjenværende virus og/eller DNA ved filtrering av den buffer-byttede formuleringen i trinn h) med et DV20 filter og et Mustang Q filter; og

j) tilsetning av polysorbat 20 (PS20) til formuleringen i trinn i) til en sluttkonsentrasjon på 0,01 % (vekt/vol).

2. Anvendelse av en formulering ifølge et hvilket som helst av kravene 3-12, som omfatter et renset rekombinant humant N-acetylgalaktosamin-6-sulfatase (GALNS)-enzym til fremstilling av et medikament for behandling av et individ som lider av mukopolysakkaridose type IVa (MPS IVa) eller Morquio A-syndrom.

3. En formulering som omfatter

(a) rekombinant human N-acetylgalaktosamin-6-sulfatase (GALNS) enzym renset i henhold til krav1, nevnte GALNS-enzym som omfatter en aminosyresekvens minst 95 % identisk til aminosyrer 27 til 522 i SEKV ID Nr.:4, og

som har en renhet på minst 95 % som bestemt ved Coomassie Blue-farging når utsatt for SDS-PAGE under ikke-reduserende betingelser, som har minst 50 % ombytting av cysteinresten i posisjon 53 til C_α-formylglysin (FGly), og

som har mellom 0,5 til 0,8 bis-fosforylert oligomannose-kjeder per monomer proteinkjede,

hvor minst 98 % av nevnte GALNS-enzym er i forløperformen som bestemt ved SDS-CGE, og

(b) én eller flere farmasøytisk akseptable bærere, fortynningsmidler eller eksipienser som omfatter:

(i) en mengde av fosfatbuffer som er effektiv til å redusere defosforylering av nevnte GALNS-enzym, hvor fosfatbufferen er NaH₂PO₄ ved en konsentrasjon fra rundt 25 mM til 75 mM; og

(ii) en stabiliserende mengde av følgende: et argininsalt eller -buffer, eventuelt arginin-hydroklorid, hvor argininsaltet eller -bufferen er ved en konsentrasjon fra rundt 10 mM til 50 mM; et polysorbat, eventuelt polysorbat 20; og en treverdig eller høyere sukkeralkohol, eventuelt sorbitol;

5 hvor nevnte formulering er ved en pH på rundt 5,0-5,8.

4. Formuleringen ifølge krav 3, hvor formuleringen som ytterligere omfatter en andre buffer, eventuelt acetatbuffer.

10 **5.** Formuleringen ifølge krav 3, hvor GALNS-enzymet er minst 95 % rent som bestemt ved RP-HPLC.

6. Formuleringen ifølge krav 3, hvor mellom 50 % til 80 % av GALNS-enzymet binder til en mannose-6-fosfatreseptor-kolonne.

15

7. Formuleringen ifølge krav 3, hvor GALNS-enzymet oppviser et spesifikt opptak (Kuptake) inn i fibroblaster som er 1 til 5 nM, fortrinnsvis 1 til 3,5 nM.

20 **8.** Formuleringen ifølge krav 3, hvor konsentrasjonen av GALNS-enzym er fra rundt 0,5 til 1,5 mg/ml.

9. Formuleringen ifølge krav 4, hvor buffermidlene er NaOAc/HOAc og NaH₂PO₄.

25 **10.** Formuleringen ifølge krav 9, hvor konsentrasjonen av NaOAc/HOAc er fra rundt 10 til 30 mM og konsentrasjonen av NaH₂PO₄ er fra rundt 25 til 75 mM.

10. Formuleringen ifølge krav 9, hvor konsentrasjonen av NaOAc/HOAc er fra rundt 10 til 30 mM og konsentrasjonen av NaH₂PO₄ er fra rundt 25 til 75 mM.

30 **11.** Formuleringen ifølge krav 3, hvor stabilisatorene er arginin HCl, polysorbat 20 og sorbitol.

35 **12.** Formuleringen ifølge krav 11, hvor konsentrasjonen av arginin HCl er fra rundt 10 til 50 mM, konsentrasjonen av polysorbat 20 er fra rundt 0,005 % til 0,015 % (vekt/vol), og konsentrasjonen av sorbitol er fra rundt 1,0 % til 3,0 % (vekt/vol).

13. En formulering som omfatter

(a) rekombinant humant N-acetylgalaktosamin-6-sulfatase (GALNS)-enzym rensset i henhold til krav1, nevnte GALNS-enzym som omfatter en aminosyresekvens minst 95 % identisk til aminosyrer 27 til 522 i SEKV ID Nr.: 4, og
 5 som har en renhet på minst rundt 95 % som bestemt ved Coomassie Blue-farging når utsatt for SDS-PAGE under ikke-reduserende betingelser, som har minst rundt 50 % ombytting av cysteinresten i posisjon 53 til C_α-formylglysin (FGly), og
 som har mellom 0,5 til 0,8 bis-fosforylert oligomannosekjeder per monomer
 10 proteinkjede,
 hvor minst 98 % av nevnte GALNS-enzym er i forløperformen som bestemt ved Coomassie Blue-farging når utsatt for SDS-PAGE under reduserende betingelser, og

(b) én eller flere farmasøytisk akseptable bærere, fortynningsmidler eller
 15 eksipienser som omfatter:

(i) NaOAc/HOAc og NaH₂PO₄ som buffermidler, hvor konsentrasjonen av NaOAc/HOAc er rundt 20 +/- 10 mM og konsentrasjonen av NaH₂PO₄ er rundt 50 +/-25 mM;

(ii) Arginin HCl, polysorbat 20 og sorbitol som stabilisatorer, hvor konsentrasjonen
 20 av arginin HCl er rundt 30 +/- 20 mM, konsentrasjonen av polysorbat 20 er rundt 0,01 % +/- 0,005 % (vekt/vol) og konsentrasjonen av sorbitol er rundt 2,0 % +/- 1,0 % (vekt/vol); og

(iii) en pH på rundt 5,4 +/- 0,4.

25 **14.** Formuleringen ifølge krav 13 hvor den ene eller flere farmasøytisk akseptable bærere, fortynningsmidler eller eksipienser består i det vesentlige av:

(i) NaOAc/HOAc, hvor konsentrasjonen av NaOAc/HOAc er rundt 20 +/- 10 mM;

(ii) NaH₂PO₄, hvor konsentrasjonen av NaH₂PO₄ er rundt 50 +/-25 mM; og

(iii) Arginin HCl, polysorbat 20 og sorbitol som stabilisatorer, hvor konsentrasjonen
 30 av arginin HCl er rundt 30 +/- 20 mM, konsentrasjonen av polysorbat 20 er rundt 0,01 % +/- 0,005 % (vekt/vol) og konsentrasjonen av sorbitol er rundt 2,0 % +/- 1,0 % (vekt/vol).