



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3025728 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 38/51 (2006.01)
A61K 47/10 (2017.01)
A61K 47/18 (2017.01)
A61P 3/00 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2018.11.19
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2018.08.08
(86)	European Application Nr.	15202466.7
(86)	European Filing Date	2011.02.03
(87)	The European Application's Publication Date	2016.06.01
(30)	Priority	2010.02.04, US, 301478 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, USA
(72)	Inventor	KAKKIS, Emil D., 546 Biscayne Drive, San Rafael CA 94901, USA VELLARD, Michel Claude, 191 Oak Drive, San Rafael, CA California 94901, USA WENDT, Daniel J., 496 La Vista Road, Walnut Creek, CA California 94598, USA MUTHALIF, Mubarak, 40 Little Creek Lane, Novato, CA California 94945, USA OKHAMAFE, Augustus O., 5310 Crystyl Ranch Drive, Concord, CA California 94521, USA BELL, Sean M., 19 Ridge Avenue, San Rafael, CA California 94901, USA ZECHERLE, G. Nick, 2052 Carolyn Way, Novato, CA California 94945, USA ANTONSEN, Kris, 211 Tunnel Avenue, Richmond, CA California 94801, USA ZHANG, Yanhong, 619 Tanbark Terrace, San Rafael, CA California 94903, USA LY, Kieu Y., 1571 24th Ave, San Francisco, CA California 94122, USA FITZPATRICK, Paul A., 875 La Playa 275, San Francisco, CA California 94121, USA
(74)	Agent or Attorney	BRYN AARFLOT AS, Stortingsgata 8, 0161 OSLO, Norge

(54)	Title	METHOD FOR PURIFYING PROKARYOTIC PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE VARIANTS
(56)	References Cited:	US-A1- 2008 008 695, US-A1- 2009 047 265

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/>

P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåte for rensing av en *Anabaena variabilis* fenylalanin ammoniakk-lyase (AvPAL) variant med minimal aggregering omfattende:
- 5 (a) lysing av bakterieceller som inneholder AvPAL-varianten ved homogenisering for å danne et cellelysat;
- (b) oppvarming av cellelysatet til 65 °C i 30 til 120 minutter;
- (c) sentrifugering av det oppvarmede cellelysatet, hvor en supernatant som
- 10 omfatter AvPAL-varianten beholdes;
- (d) filtrering av supernatanten for å fjerne presipitater; og
- (e) separering av AvPAL-varianten fra kontaminerende proteiner ved sekvensiell kromatografi over en anionbytter (AIEX) kolonne etterfulgt av en hydrofob interaksjons (HIC) kolonne, hvor eluatet fra HIC-kolonnen omfatter AvPAL-varianten,
- 15 hvor cysteinrestene i posisjonene 503 og 565 i AvPAL-varianten er blitt substituert med serinrester (SEKV ID NR:11).
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor fremgangsmåten er en fremgangsmåte for rensing av en pegylert *Anabaena variabilis* fenylalanin ammoniakk-lyase (AvPAL)
- 20 variant med minimal aggregering og hvor fremgangsmåten videre omfatter:
- (f) ultrafiltrering eller ultrafiltrering/diafiltrering av eluatet fra HIC-kolonnen som omfatter AvPAL-varianten;
- (g) pegylering av AvPAL-varianten ved å blande polyetylen glykol med AvPAL-varianten;
- 25 (h) fjerning av fri polyetylen glykol fra den pegylerte AvPAL-varianten ved ultrafiltrering/diafiltrering; og
- (i) formulering av den pegylerte AvPAL-varianten, hvor AvPAL-varianten omfatter polyetylen glykol.
- 30 3. Fremgangsmåte ifølge krav 2, hvor forholdet mellom AvPAL-varianten og polyetylen glykolen er omtrent 1:3.
4. Fremgangsmåte ifølge krav 2 eller 3, som videre omfatter frysing og tining av
- 35 eluatet fra HIC-kolonnen som omfatter AvPAL-varianten oppnådd i trinn (e), hvor en eller flere polyoler eller sukkerer valgt fra gruppen bestående av glycerol, sukrose,

glukose, trehalose, mannitol og sorbitol blir tilsatt til HIC-kolonne eluatet før frysing.

5. Fremgangsmåte ifølge krav 4, hvor polyolen er glycerol, fortrinnsvis hvor konsentrasjonen av glycerol er 10% (volum/volum).

5

6. Fremgangsmåte ifølge krav 4 eller 5, hvor sukkeret er sukrose, fortrinnsvis hvor konsentrasjonen av sukrose er 10% (volum/volum).

7. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 4 til 6, hvor frysing eller tining av eluatet fra HIC-kolonnen som omfatter AvPAL-varianten utføres i atskilte temperaturtrinn.

10

8. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 4 til 7, hvor frysing og tining av eluatet fra HIC-kolonnen som omfatter AvPAL-varianten utføres i atskilte temperaturtrinn.

15

9. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 2 til 8, hvor en diafiltreringsbuffer i trinn (f) omfatter kaliumfosfat (KPi) og ett eller flere midler som består av trans-kannelsyre (t-CA) og glycerol, fortrinnsvis hvor diafiltreringsbufferen omfatter 50 mM KPi, 10 mM t-CA, 5% glycerol, pH 8,5.

20

10. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 2 til 9, hvor et ikke-ionisk vaskemiddel tilsettes til det ultrafiltrerte eller ultrafiltrerte/diafiltrerte eluatet fra HIC-kolonnen som omfatter AvPAL-varianten oppnådd i trinn (f).

25

11. Fremgangsmåte ifølge krav 10, hvor det ikke-ioniske vaskemiddelet er polysorbat 80 (PS80), fortrinnsvis hvor konsentrasjonen av PS80 er 0,02%.

12. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 11, hvor AIEX-kolonnen er en Toyopearl Giga Cap Q 650M kolonne.

30

13. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 12, hvor HIC-kolonnen er en Toyopearl Butyl 650M kolonne.

35