



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3120153 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
G01N 33/50 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2020.12.07
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2020.08.19
(86)	European Application Nr.	15798418.8
(86)	European Filing Date	2015.11.23
(87)	The European Application's Publication Date	2017.01.25
(30)	Priority	2014.11.27, EP, 14195277
(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
	Designated Validation States:	MA MD
(73)	Proprietor	Gentium S.r.l., Piazza XX Settembre 2, 22079 Villa Guardia (Como), Italia
(72)	Inventor	IGNONI, Terenzio, Via Rigamonti 17/E, I-22020 San Fermo Della Battaglia (CO), Italia KUMAR, Vijay, Via Galilei 4, I-22070 Casnate (CO), Italia VERGA, Claudio, Via Beltramo 18, I-22070 Bregnano (CO), Italia
(74)	Agent or Attorney	ONSAGERS AS, Postboks 1813, Vika, 0123 OSLO, Norge

(54)	Title	CELLULAR-BASED METHOD FOR DETERMINING THE POTENCY OF DEFIBROTIDE
(56)	References Cited:	WO-A1-2013/190582 EISSNER GÜNTHER ET AL: "Fludarabine induces apoptosis, activation, and allogenicity in human endothelial and epithelial cells: protective effect of defibrotide.", BLOOD 1 JUL 2002, vol. 100, no. 1, 1 July 2002 (2002-07-01), pages 334-340, XP002738944, ISSN: 0006-4971 SCHROEDER H: "Defibrotide protects endothelial cells, but not L929 tumour cells, from tumour necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity", JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY, JOHN WILEY & SONS LTD, LONDON; GB, vol. 47, no. 3, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 250-252, XP008022870, ISSN: 0022-3573

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 måling av den biologiske aktiviteten i et prøveparti med defibrotid som omfatter:

5 dyrke pattedyrceller i kultur,

inkubere cellene med en løsning som inneholder minst ett cytotoksisk middel og minst én konsentrasjon med defibrotid fra prøvepartiet,

bestemme levedyktigheten til cellene som er eksponert for prøvepartiet med defibrotid etter en inkuberingsperiode, sammenligne cellelevedyktighet med
10 cellelevedyktigheten for et referanseparti med defibrotid,

og beregne den biologiske aktiviteten i prøvepartiet med defibrotid basert på sammenligningen,

der det nevnte minst ene cytotoksiske middelet er fludarabin, 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoradenin (F-Ara-A) eller doksorubicin.

15

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,

der cellene blir inkubert med det cytotoksiske middelet og minst fire ulike konsentrasjoner med defibrotid fra prøvepartiet, og der cellelevedyktigheten blir bestemt for hver av konsentrasjonene for å danne en dose-respons-kurve.

20

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2,

der cellelevedyktigheten som er målt for prøvepartiet med defibrotid blir sammenlignet med en kalibreringskurve som er oppnådd fra cellelevedyktighetsmålinger med referansepartiet med defibrotid.

25

4. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 1 til 3,

der beregning av den biologiske aktiviteten i defibrotidprøvepartiet omfatter å bestemme et biologisk aktivitetsforhold relativt til den biologiske aktiviteten til et referanseparti med defibrotid.

5. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kavene 1 til 4,
der pattedyrcellene er humane endotelceller, humane epitelceller, humane sinusoidale leverendotelceller eller humane mikrovaskulære endotelceller.
- 5
6. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 1 til 5,
der pattedyrcellene er til stede i en tetthet på omtrent 5×10^4 celler/ml til omtrent 5×10^5 celler/ml.
- 10
7. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
der fludarabin eller F-Ara-A er til stede i løsningen ved en konsentrasjon på omtrent $10 \mu\text{g/ml}$ til omtrent $50 \mu\text{g/ml}$ eller der doksorubicin er til stede i løsningen ved en konsentrasjon på omtrent $0,1 \mu\text{g/ml}$ til omtrent $10 \mu\text{g/ml}$.
- 15
8. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kavene 1 til 7,
der den minst ene konsentrasjonen med defibrotid fra prøvepartiet er i området av omtrent $1 \mu\text{g/ml}$ til omtrent $100 \mu\text{g/ml}$.
- 20
9. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kavene 1 til 8,
der inkuberingsperioden er minst 24 timer, minst 48 timer eller minst 72 timer.
10. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kavene 1 til 9,
der bestemmelse av cellelevedyktighet omfatter å utføre en kolorimetrisk analyse basert på reduksjonen av tetrazoliumfargestoffer.
- 25
11. Fremgangsmåte ifølge krav 10,
der tetrazoliumfargestoffet er 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid eller 2-(2-metoksy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium.

12. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kavene 1 til 11, der bestemmelse av cellelevedyktighet omfatter måling av absorbansen til løsningen etter inkubering med cellene.

5

13. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kavene 1 til 12, der prøvepartiet med defibrotid er ekstrahert fra storfevev eller svinevev.

10 14. Fremgangsmåte for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning som omfatter defibrotid, der fremgangsmåten ifølge ethvert av kravene 1 til 13 blir benyttet for å måle den biologiske aktiviteten til defibrotid for å:

a) justere mengden med defibrotid som er inkludert i sammensetningen for å sikre at sammensetningen omfatter nøyaktige og konsekvente doseringer, og/eller

15 b) måle den biologiske aktiviteten i ulike partier med defibrotid som er fremstilt på ulike steder, med ulike fremgangsmåter, eller fra ulike kilder.

20 15. Fremgangsmåte for å overvåke stabiliteten til defibrotidpartier eller farmasøytiske sammensetninger som omfatter defibrotid, der fremgangsmåten ifølge ethvert av kravene 1 til 13 blir benyttet for å måle den biologiske aktiviteten til defibrotid i partiet eller sammensetningen over tid, eventuelt der den biologiske aktiviteten til defibrotid blir målt: månedlig, hvert halvår, årlig, etter eksponering overfor ekstreme betingelser for å overvåke aktiviteten til defibrotid, eller for å identifisere partier eller sammensetninger som er forringet eller er nedbrutt.

25