



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3134506 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 1/08 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2019.11.11
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2019.08.07
(86)	European Application Nr.	15783316.1
(86)	European Filing Date	2015.04.24
(87)	The European Application's Publication Date	2017.03.01
(30)	Priority	2014.04.25, US, 201461984503 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	Translate Bio, Inc., 29 Hartwell Avenue, Lexington, MA 02421, USA
(72)	Inventor	DEROSA, Frank, 300 Shire Way, Lexington, Massachusetts 02421, USA DIAS, Anusha, 300 Shire Way, Lexington, Massachusetts 02421, USA KARVE, Shrirang, 300 Shire Way, Lexington, Massachusetts 02421, USA HEARTLEIN, Michael, 300 Shire Way, Lexington, Massachusetts 02421, USA
(74)	Agent or Attorney	OSLO PATENTKONTOR AS, Hoffsvæien 1A, 0275 OSLO, Norge

(54)	Title	METHODS FOR PURIFICATION OF MESSENGER RNA
(56)	References Cited:	WO-A1-2012/077080 US-A1- 2006 059 576 US-A1- 2010 120 129 WO-A1-2014/152966 WO-A1-98/05673 WO-A1-2009/093142 BHADURI ET AL.: 'Procedure for the Preparation of Milligram Quantities of Adenovirus Messenger Ribonucleic Acid' JOURNAL OF VIROLOGY vol. 10, no. 6, December 1972, pages 1126 - 1129, XP055232582

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 rensing av messenger-RNA (mRNA), omfattende
 - (a) utfelling av mRNA fra et urent preparat; og
 - (b) å utsette det urene preparatet som omfatter utfelt mRNA for en
5 rensesprosess som involverer membranfiltrering slik at det utfelte mRNA blir fanget opp av en membran; og
 - (c) vasking av det fangede utfelte mRNA; og
 - (d) eluering av det fangede utfelte mRNA fra membranen ved
gjenoppløseliggjøring av mRNA, og som derved resulterer i en rensset
10 mRNA-løsning.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor rensesprosessen som involverer membranfiltrering, er (i) tangensiell strømningsfiltrering, eller (ii) direkte strømningsfiltrering.
15
3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 til 2, hvor trinnet med utfelling av mRNA omfatter behandling av det urene preparatet med en løsning omfattende et reagens valgt fra gruppen bestående av litiumklorid, kaliumklorid, guanidiniumklorid, guanidiniumtiocyanat, guanidiniumisothiocyanat, ammoniumacetat og
20 kombinasjoner derav, eventuelt hvor reagenset er guanidiniumtiocyanat.
4. Fremgangsmåte ifølge krav 3, hvor løsningen omfatter:
 - (i) 4M guanidiniumtiocyanat, 0,5% natriumlaurylsarkosyl og 25 mM natriumcitrat;
 - 25 (ii) 4M guanidiniumtiocyanat og 0,5% natriumlaurylsarkosyl; eller
 - (iii) 4M guanidiniumtiocyanat og 25 mM natriumcitrat.
5. Fremgangsmåte ifølge krav 1 til 4, hvor trinnet med utfelling av mRNA omfatter et trinn for behandling av det urene preparatet med absolutt etanol.
30
6. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor membranen er valgt fra gruppen bestående av polyetersulfon (mPES) (ikke modifisert), polyetersulfon (mPES) hulfibermembran, polyvinylidenfluorid (PVDF), celluloseacetat, nitrocellulose, MCE (blandede celluloseestere), ultrahøy MW-
35 polyetylen (UPE), polyfluortetraetylen (PTFE), nylon og kombinasjon derav.

7. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor vasketrinnet omfatter flere skyllesykluser som anvender en vaskeoppløsning omfattende en guanidiniumbuffer og etanol, fulgt av ca. 70-80% etanol, eventuelt hvor de flere skyllesyklusene er mer enn 5 sykluser.

5

8. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor elueringstrinnet omfatter gjenoppløseliggjøring av det fangede utfelte mRNA med RNase-fritt vann, eventuelt hvor det RNase-frie vannet blir resirkulert i 5-10 minutter.

10

9. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor fremgangsmåten videre omfatter et trinn med dialysering av den rensede mRNA-løsningen, eventuelt hvor den rensede mRNA-løsningen blir dialysert med 1 mM natriumcitrat ved anvendelse av en 100 kDa molekylvekt utesluttende membran (MWCO).

15

10. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor mRNA er syntetisert *in vitro* og det urene preparatet omfatter en *in vitro* mRNA-syntesereaksjonsblanding, eventuelt hvor det urene preparatet omfatter for tidlig terminerte RNA-sekvenser og / eller enzymreagenser brukt i *in vitro*-syntese.

20

11. Fremgangsmåte ifølge krav 10, hvor renseprosessen som involverer membranfiltrering, er tangentiell strømningsfiltrering og hvor den rensede mRNA-løsningen inneholder mindre enn 1%, mindre enn 0,5%, mindre enn 0,1% for tidlig terminerte RNA-sekvenser og / eller enzym-reagenser brukt i *in vitro*-syntese, eventuelt hvor de for tidlig terminerte RNA-sekvenser og / eller enzymreagenser brukt i *in vitro*-syntese, måles via sølvfarging, gelelektroforese, HPLC, UPLC og / eller kapillær elektroforese, eventuelt hvor (i) de for tidlige terminerte RNA-sekvenser omfatter mindre enn 15 baser, f.eks ca. 8-12 baser, eller (ii) enzymreagensene anvendt i *in vitro*-syntese omfatter T7 RNA-polymerase, DNase I, pyrofosfatase og / eller RNase-inhibitor.

25

30

12. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor mRNA blir renset:

35

(a) i en skala på eller større enn 1 gram, 10 gram, 100 gram, 1 kg, 10 kg eller 100 kg per batch, og / eller

(b)

(i) før en hette og hale tilsettes mRNA,

- (ii) etter en hette og hale tilsettes mRNA,
- (iii) etter en hette tilsettes, eller
- (iv) både før og etter at en hette og / eller hale tilsettes mRNA.

5 13. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor mRNA:

(a) er, eller er større, enn 1 kb, 1,5 kb, 2 kb, 2,5 kb, 3 kb, 3,5 kb, 4 kb, 4,5 kb, 5 kb, 6 kb, 7 kb, 8 kb, 9 kb, 10 kb, 11 kb, 12 kb, 13 kb, 14 kb, 15 kb, eller 20 kb i lengde, og / eller

10 (b) omfatter en eller flere modifikasjoner for å øke stabiliteten, eventuelt hvor den ene eller flere modifikasjonene omfatter modifisert nukleotid og / eller modifisert sukkerfosfat-ryggrader eller er umodifisert.

15 14. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor 95%, 98%, 99% eller mer av det rensede mRNA ikke blir nedbrutt, bestemt ved RNA-agarosegelelektroforese i forhold til mRNA før rensing.

20 15. Fremgangsmåte for fremstilling av messenger-RNA (mRNA) omfattende:
 å syntetisere av mRNA *in vitro*; og
 rensing av *in vitro*-syntetisert mRNA ved anvendelse av en fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav.