



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3137621 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12P 21/06 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2019.10.28
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2019.07.17
(86)	European Application Nr.	15721027.9
(86)	European Filing Date	2015.04.29
(87)	The European Application's Publication Date	2017.03.08
(30)	Priority	2014.04.29, GB, 201407525
(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	Ipsen Bioinnovation Limited, 102 Park Drive Milton Park, Abingdon, Oxfordshire OX14 4RY, Storbritannia
(72)	Inventor	PALAN, Shilpa, Ipsen Bioinnovation Limited102 Park DriveMilton Park, AbingdonOxfordshire OX14 4RY, Storbritannia LIU, Sai Man, Ipsen Bioinnovation Limited102 Park DriveMilton Park, AbingdonOxfordshire OX14 4RY, Storbritannia HACKETT, Gavin Stephen, Ipsen Bioinnovation Limited102 Park DriveMilton Park, AbingdonOxfordshire OX14 4RY, Storbritannia
(74)	Agent or Attorney	BRYN AARFLOT AS, Stortingsgata 8, 0161 OSLO, Norge

(54)	Title	MANUFACTURE OF RECOMBINANT CLOSTRIDIUM BOTULINUM NEUROTOXINS
------	-------	---

(56)	References Cited:	US-A1- 2005 238 669 EP-A1- 2 524 963 US-A1- 2011 092 682 US-A- 5 846 929 US-A1- 2006 228 780 US-A1- 2011 008 843 WO-A1-2014/080206 CLIFFORD C. SHONE ET AL: "Inactivation of Clostridium botulinum type A neurotoxin by trypsin and purification of two tryptic fragments. Proteolytic action near the COOH-terminus of the heavy subunit destroys toxin-binding activity", EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 151, no. 1, 1 August 1985 (1985-08-01), pages 75-82, XP055199874, ISSN: 0014-2956, DOI: 10.1111/j.1432-1033.1985.tb09070.x
------	----------------------	--

MALIZIO C ET AL: "Purification of Clostridium botulinum Type A Neurotoxin", METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, HUMANA PRESS, INC, US, vol. 145, 1 January 2000 (2000-01-01), pages 27-39, XP008123242, ISSN: 1064-3745, DOI: 10.1385/1-59259-052-7:27 [retrieved on 2008-02-05]

ANDY PICKETT ET AL: "Towards New Uses of Botulinum Toxin as a Novel Therapeutic Tool", TOXINS, vol. 3, no. 12, 12 January 2011 (2011-01-12), pages 63-81, XP055199954, DOI: 10.3390/toxins3010063

KOZAKI S ET AL: "Activation of Clostridium botulinum type B and E derivative toxins with lysine-specific proteases", FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB, vol. 27, no. 2, 1 May 1985 (1985-05-01), pages 149-154, XP023919407, ISSN: 0378-1097, DOI: 10.1111/J.1574-6968.1985.TB00658.X [retrieved on 1985-05-01]

YU Y Z ET AL: "The recombinant Hc subunit of Clostridium botulinum neurotoxin serotype A is an effective botulism vaccine candidate", VACCINE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 27, no. 21, 11 May 2009 (2009-05-11), pages 2816-2822, XP026053630, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2009.02.091 [retrieved on 2009-03-11]

YAO ZHAO ET AL: "Peg Precipitation Coupled with Chromatography is a New and Sufficient Method for the Purification of Botulinum Neurotoxin Type B", PLOS ONE, vol. 7, no. 6, 28 June 2012 (2012-06-28), page e39670, XP055199984, DOI: 10.1371/journal.pone.0039670

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 fremstilling av løselig dikjede-BoNT/A-protein, nevnte fremgangsmåte omfatter:

- 5 a) å tilveiebringe et løselig enkeltkjede-BoNT/A-protein;
 b) å kontakte nevnte BoNT/A-protein med endoproteinase Lys-C (Lys-C) i
 løsning; og
 c) å separere det løselige BoNT/A-proteinet fra Lys-C ved å bringe løsningen
10 inneholdende løselig BoNT/A-protein og Lys-C i kontakt med en hydrofob
 overflate, hvor det løselige BoNT/A-proteinet binder seg med preferanse til den
 hydrofobe overflaten.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor det løselige enkeltkjede-BoNT/A-proteinet blir
15 produsert (i) i en vertscelle, ved å uttrykke en nukleinsyre som koder for nevnte
 enkeltkjede-BoNT/A-protein i et uttrykkssystem; eller (ii) i et *in vitro*-uttrykkssystem.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 2, hvor vertscellen er en bakteriell vertscelle og
uttrykkssystemet er et bakterielt uttrykkssystem.

20 4. Fremgangsmåte ifølge krav 3, hvor det bakterielle uttrykkssystemet er et *E. coli*-
 uttrykkssystem og vertscellen er en *E. coli*-celle.

5. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 2 til 4, hvor nevnte løselige
25 enkeltkjede-BoNT/A-protein uttrykkes i cytoplasmaet til nevnte vertscelle.

6. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 2 til 5, hvor nevnte løselige
enkeltkjede-BoNT/A-protein uttrykkes ved et nivå på minst 5 mg/L.

7. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 2 til 6, omfattende lysering av
30 bakterien eller *E. coli*-vertscellen for å tilveiebringe en bakterielt eller *E. coli*-
 vertscellehomogenat inneholdende nevnte løselige enkeltkjede-BoNT/A-protein.

8. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 7, hvor den hydrofobe
35 overflaten er en inert matrise som en ligand bestående av aryl- eller alkylgrupper er
 bundet til.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 8, hvor liganden er valgt fra gruppen bestående av: butyl-, fenyl- eller oktylligander.

5 10. Fremgangsmåte ifølge krav 9, hvor en hydrofob overflate med høy ytelse blir anvendt.

11. Fremgangsmåte for fremstilling av en farmasøytisk eller kosmetisk sammensetning, omfattende trinnene:

- 10 a) å fremstille et løselig dikjede-BoNT/A-protein ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 10;
- b) å formulere dikjede-BoNT/A-proteinet som en farmasøytisk eller kosmetisk sammensetning.

15 12. Fremgangsmåte ifølge krav 11, hvor nevnte sammensetning omfatter mindre enn 5% enkeltkjede-BoNT/A, fortrinnsvis mindre enn 2% enkeltkjede-BoNT/A.

20 13. Fremgangsmåte ifølge krav 11 eller 12, hvor nevnte sammensetning inneholder endoproteinasen Lys-C (Lys-C) i en konsentrasjon på mindre enn 400 pg Lys-C per 100 ng BoNT/A-protein, eller mindre enn 300 pg Lys-C per 100 ng BoNT/A-protein, eller mindre enn 200 pg Lys-C per 100 ng BoNT/A-protein, eller mindre enn 100 pg Lys-C per 100 ng BoNT/A-protein, eller mindre enn 50 pg Lys-C per 100 ng BoNT/A-protein, eller mindre enn 20 pg Lys-C per 100 ng BoNT/A-protein, eller mindre enn 15 pg Lys-C per 100 ng BoNT/A-protein, eller mindre enn 10 pg Lys-C per 100 ng BoNT/A-protein.

25 14. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 11 til 13, hvor nevnte sammensetning er en flytende eller fast sammensetning.

30 15. Fremgangsmåte ifølge krav 14, hvor nevnte sammensetning omfatter et stabiliseringsmiddel, nevnte middel er fortrinnsvis et ikke-proteinstabiliserende middel.