



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3209767 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 1/14 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2021.01.04
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2020.08.05
(86)	European Application Nr.	15852227.6
(86)	European Filing Date	2015.10.19
(87)	The European Application's Publication Date	2017.08.30
(30)	Priority	2014.10.21, IN, 2343MU2014
(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	Gennova Biopharmaceuticals Ltd., P-1 IT-BT Park MIDC Phase-2, Hinjwadi, Pune - 411057, India
(72)	Inventor	RAGHUWANSHI, Arjun, GENNOVA Vaccine Formulation Centre and Research Laboratory BTS-2 Building Chrysalis Enclave Block-2 Plot-2 International Biotech Park Phase II MIDC Hinjwadi, Pune Maharashtra 411057, India SINGH KUMAR, Shrawan, GENNOVA Vaccine Formulation Centre and Research Laboratory BTS-2 Building Chrysalis Enclave Block-2 Plot-2 International Biotech Park Phase II MIDC Hinjwadi, Pune Maharashtra 411057, India KUMAR, Ankit, GENNOVA Vaccine Formulation Centre and Research Laboratory BTS-2 Building Chrysalis Enclave Block-2 Plot-2 International Biotech Park Phase II MIDC Hinjwadi, Pune Maharashtra 411057, India SAHOO RANJAN, Mihir, GENNOVA Vaccine Formulation Centre and Research Laboratory BTS-2 Building Chrysalis Enclave Block-2 Plot-2 International Biotech Park Phase II MIDC Hinjwadi, Pune Maharashtra 411057, India SINGH, Sanjay, GENNOVA Vaccine Formulation Centre and Research Laboratory BTS-2 Building Chrysalis Enclave Block-2 Plot-2 International Biotech Park Phase II MIDC Hinjwadi, Pune Maharashtra 411057, India
(74)	Agent or Attorney	CURO AS, Vestre Rosten 81, 7075 TILLER, Norge

(54)	Title	A NOVEL PURIFICATION PROCESS FOR ISOLATION AND COMMERCIAL PRODUCTION OF RECOMBINANT TNK-TPA (TENECTEPLASE)
(56)	References Cited:	WO-A1-2011/015922 WO-A1-2012/066569 IN-A- 1807M UM2 006 IN-A- 3516M UM2 010

BEHROUZ R: 'Intravenous tenecteplase in acute ischemic stroke: an updated review' JOURNAL OF NEUROLOGY vol. 261, no. 6, June 2014, pages 1069 - 72, XP055434203
STABY ET AL.: 'Comparison of chromatographic ion-exchange resins V. Strong and weak cation-exchange resins' JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY. A vol. 1118, no. 2, June 2006, pages 168 - 79, XP024967288
SANCHEZ ET AL.: 'Design of a recombinant tissue plasminogen activator production plant' BIOTECHNOLOGY FINAL PROJECT 2013, XP055434258

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. Framgangsmåte for isolering og rensing av TNK-tPA, hvilken framgangsmåte omfatter trinn med å:

- 5 (i) underlegge cellefri innhøsting framskaffet fra CHO-cellekultur for affinitetskromatografi for å fange TNK-tPA og framskaffe et eluat som inneholder delvis rensset TNK-tPA; hvori nevnte affinitetskromatografi omfatter Blue Sepharose 6 FF som en stasjonær fase og en mobil fase, hvori den mobile fasen er en blanding av natriumfosfatbuffer, natriumklorid og urea;
- 10 (ii) underlegge eluatet fra trinn (i) for affinitetskromatografi for ekstra rensing av TNK-tPA og framskaffe et eluat som inneholder primært TNK-tPA; hvori nevnte affinitetskromatografi omfatter Lysine Hyper D som en stasjonær fase og en mobil fase, hvori den mobile fasen er en blanding av natriumacetatbuffer, urea og epsilon aminokapronsyre (EACA);
- 15 (iii) viral inaktivering av eluat i trinn (ii) for å framskaffe den virale inaktivererte prøven; hvori viral inaktivering utføres ved lav pH og kjemisk inaktivering, hvori kjemisk inaktivering utføres ved behandling av prøven med natriumkaprylat i nærvær av urea;
- 20 (iv) underlegge den virale inaktivererte prøven i trinn (iii) for en affinitets-kromatografi-III for ekstra rensing for å framskaffe et eluat som inneholder primært høy-renset TNK-tPA; hvori nevnte affinitetskromatografi omfatter keramisk hydroksy-apatitt (CHT) som en stasjonær fase og en mobil fase, hvori den mobile fasen er en blanding av fosfatbuffer, 2-(N-morfolin)-etansulfosyrehydrat (MES-Hydrat), natriumklorid og urea;
- 25 (v) underlegge eluatet fra trinn (iv) for kationbytte-kromatografi for å framskaffe et eluat som inneholder et høy-renset preparat av TNK-tPA; hvori nevnte kationbytte-kromatografi omfatter Fractogel-SO₃ som en stasjonær fase og en mobil fase, hvori den mobile fasen er en blanding av L-Arginin, O-fosforsyre og polysorbat-20;
- 30 (vi) underlegge eluatet fra trinn (v) for virusreduksjons-filtrering for fjerning av virus som måtte være stede; hvori virusfiltrering utføres med Polyetersulfon (PES)-nanofilter med en størrelse i et intervall fra 15-20 nm;
- (vii) konsentrere prøven fra trinn (vi) for å framskaffe TNK-tPA ved tangential-strømfiltrering; hvori utbyttet av prosessen er mer enn 60 % og renheten av TNK-tPA framskaffet er mer enn 95 % målt med størrelses-ekskluderings-kromatografi.

2. Framgangsmåte ifølge krav 1, hvori renheten av TNK-tPA er mer enn 95 % ved størrelses-ekskluderings-kromatografi og hvori de andre kritiske kvalitetsattributtene er:

SDS PAGE	Ingen ekstra binding forskjellig fra prinsipiell binding observert
Monomer (%)	Mer enn 95 %
Innhold av enkeltkjede (%)	Mer enn 60 %
Vertscelle-protein (HCP) (ppm)	Mindre enn 100
Vertscelle-DNA (HCD) (ng/dose)	Mindre enn 10

3. Framgangsmåte ifølge krav 1, hvori i trinn (i) natriumfosfat er til stede i et intervall fra 20-40mM, natriumklorid er til stede i et intervall fra 1, 5-2 M og urea er til stede i et intervall fra 2-3 M; hvori pH i den mobile fasen er til stede i et intervall fra 7,2-7,4.
4. Framgangsmåte ifølge krav 3, hvori nevnte affinitets-kromatografi framskaffer 0,8 - 1,5 logg-reduksjon av vertscelle-proteiner (HCP).
5. Framgangsmåte ifølge krav 1, hvori i trinn (ii) natriumacetat er til stede i et intervall fra 5-15 mM, urea er til stede i et intervall fra 2-3 M og EACA er til stede i et intervall fra 0,1-0,2 mM; hvori pH i den affinitets-kromatografi-mobile fasen ligger i intervallet pH 4,5-5.
6. Framgangsmåte ifølge krav 5, hvori nevnte affinitetskromatografi resulterer i 1-1,5 logg-reduksjon av vertscelleproteiner (HCP) og 1-4 logg-reduksjon av viral klaring; hvori, fortrinnsvis nevnte affinitetskromatografi resulterer i mer enn 1,5 logg-reduksjon med XMuLV og mer enn 4 logg-reduksjon med PRV.
7. Framgangsmåte ifølge krav 1, hvori i trinn (iii) natriumkaprylat er til stede i intervallet 0,01 % - 0,07 % (w/v), fortrinnsvis i intervallet 0,05 %; hvori konsentrasjonen av urea er til stede i intervallet 2-3 M; hvori viral inaktivering utføres ved å holde prøven i et tidsrom på 40-80 minutter; hvori holdingen av prøven finner sted ved en temperatur intervall fra 20-30 °C.
8. Framgangsmåte ifølge krav 7, hvori den lave pH og kjemisk inaktivering resulterer i mer enn 5 logg-reduksjon med XMuLV og PRV.

9. Framgangsmåte ifølge krav 1, hvori i trinn (iv) fosfatbufferen er til stede i et intervall fra 5-15 mM, MES-hydrat er til stede i et intervall fra 2-20 mM, urea er til stede i et intervall fra 1-3 M og natriumklorid er til stede i et intervall fra 0,1 til 0,5 M;
- hvori den mobile fasen pH er i intervallet fra 6 - 9;
- 5 hvori affinitets-kromatografi-elusjon som anvendes er lineær salt-gradient;
- hvori saltet er natriumklorid og konsentrasjonen av natriumklorid er i et intervall fra 0,1-1,0 M natriumklorid.
10. Framgangsmåte ifølge krav 9, hvori nevnte affinitetskromatografi resulterer i 0,5-1 logg-reduksjon av vertscelleproteiner (HCP) og 2-4 logg av viral klaring,
- 10 eller hvori nevnte affinitetskromatografi resulterer i mer enn 4 logg-reduksjon med XMuLV og PRV og mer enn 3 logg-reduksjon med MMV og Reo 3-viruser.
11. Framgangsmåte ifølge krav 1, hvori i trinnet (v) nevnte L-Arginin er til stede i intervallet fra 250-350 mM, O-fosforsyre er til stede i intervallet fra 0,6 %-0,8 % og polysorbat-20 er til stede i intervallet 0,04 til 0,05 %; hvori den mobile fasen med pH er i intervallet fra 7,3 til 7,5.
- 15 12. Framgangsmåte ifølge krav 11, hvori nevnte kationbytte-kromatografi resulterer i mer enn 1 logg viral klaring med MMV og mer enn 0,5 logg klaring for vertscelleproteiner (HCP).
13. Framgangsmåte ifølge krav 1, hvori i trinn (vi) virusfiltreringen resulterer i mer enn 4 logg-reduksjon av XMuLV, mer enn 3 logg-reduksjon av PRV, mer enn 4 logg-reduksjon av Reo-3 og mer enn 4,5 logg-reduksjon av MMV.
- 20 14. Framgangsmåte ifølge krav 1, hvori i trinn (vii) filteret er ultrafiltrerings-membran;
- hvori ultrafiltrerings-membranen er PES;
- hvori størrelsen av ultrafiltrerings-membranen er i et intervall fra 5-30 kDa, hvori fortrinnsvis størrelsen av ultrafiltrerings-membranen fortrinnsvis er 10 kDa,
- hvori konsentratet fortrinnsvis er TNK-tPA-retentat.
- 25 15. Framgangsmåte ifølge krav 1, hvori periodisk motstrøms-kromatografi anvendes for Affinitet-I kromatografi definert i trinn (i) ifølge krav 1.
16. Framgangsmåte ifølge krav 1, hvori tilnærmingen med inline-kondisjonering anvendes for framstilling av buffer og føde for Affinitet-I-kromatografi definert i trinn (i) ifølge krav 1, Affinitet-II-kromatografi som definert i trinn (ii) ifølge krav 1, Affinitet-III-kromatografi (Mixed Mode-

kromatografi MMC) som definert i trinn (iv) ifølge krav 1, og ionebytte-kromatografi som definert i trinn (v) ifølge krav 1.