



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3281636 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 38/46 (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2020.11.02
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2020.08.05
(86)	European Application Nr.	17192938.3
(86)	European Filing Date	2011.02.23
(87)	The European Application's Publication Date	2018.02.14
(30)	Priority	2010.02.24, DK, 201070067 2010.02.24, US, 307587 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
(62)	Divided application	EP2538968, 2011.02.23
(73)	Proprietor	Chiesi Farmaceutici S.p.A., Via Palermo 26/A, 43122 Parma, Italia
(72)	Inventor	Fogh, Jens, Bjergagervej 37, 3540 Lynge, Danmark Andersson, Claes, Tallåsvägen 5, 187 43 Täby, Sverige Weigelt, Cecilia, Banérgatan 27, 1 tr., 115 22 Stockholm, Sverige Hydén, Pia, Dalgången 6, 182 74 Stocksund, Sverige Reuterwall, Helena, Ripstigen 6, 1tr, 170 74 Solna, Sverige Nilsson, Stefan, Geijersgatan 35B, 752 31 Uppsala, Sverige
(74)	Agent or Attorney	PLOUGMANN VINGTOFT, Postboks 1003 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Title	PROCESS FOR PRODUCTION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT LYSOSOMAL ALPHA-MANNOSIDASE
------	-------	---

(56)	References Cited:	WO-A1-2005/094874 WO-A2-2007/112757 WO-A1-2009/007451 US-A1- 2009 191 178 WO-A1-02/15927
------	----------------------	--

EP-A1- 1 408 117

WO-A1-2005/073367

BERG THOMAS ET AL: "Purification and characterization of recombinant human lysosomal alpha-mannosidase", MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 73, no. 1, 24 April 2001 (2001-04-24) , pages 18-29, XP002182076, ISSN: 1096-7192, DOI: DOI:10.1006/MGME.2001.3173

FORSEE ET AL: "Purification and characterization of an alpha-1,2-mannosidase involved in processing asparagine-linked oligosaccharides.", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 264, no. 7, 1 March 1989 (1989-03-01) , pages 3869-76, XP055000022, ISSN: 0021-9258

GUOFENG ZHAO ET AL: "Ligands for mixed-mode protein chromatography: Principles, characteristics and design", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 144, no. 1, 12 October 2009 (2009-10-12), pages 3-11, XP055000021, ISSN: 0168-1656, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2009.04.009

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. Framgangsmåte for å rense rekombinant human lysosomal alfa-mannosidase fra en cellekultur, der en fraksjon av cellekulturen som omfatter rekombinant human lysosomal alfa-mannosidase gjennomgår kromatografi på en harpiks som omfatter en multimodal ligand, der den harpiksbundne multimodale liganden er et stoff som har en karboksylsyre- eller sulfonsyregruppe, der framgangsmåten fører til en sammensetning som omfatter rensset alfa-mannosidase k a r a k t e r i s e r t v e d at minst 80 % av alfa-mannosidasen er til stede som et 130 kDa glykoprotein.

2. Framgangsmåte ifølge krav 1, der cellekulturen omfatter celler som spesifikt er designet for å eksprimere den rekombinante alfa-mannosidasen, der cellene er valgt fra gruppen som består av apenyre-CVI-linje transformert av SV40 (COS-7); human embryonisk nyrelinje (293 eller 293-celler som er underklonet for vekst i suspensjonskultur); babyhamster-nyreceller (BHK); eggstokkceller/-DHFR fra kinesisk dverghamster (CHO); Sertoli-celler fra mus (TM4); apenyreceller (CV 1); nyreceller fra afrikansk grønnape (VERO-76); humane livmorhalskarsinomceller (HELA); hundenyreceller (MDCK); leverceller fra bøffelrotte (BRL 3A); humane lungeceller (W138); humane leverceller (Hep G2, HB 8065); brystsvulst fra mus (MMT 060562); TRI-celler; MRC-5-celler; FS4-celler; og en human hepatomlinje (Hep G2).

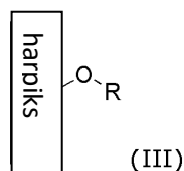
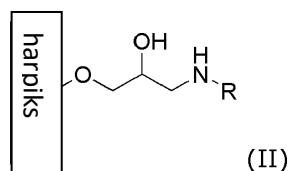
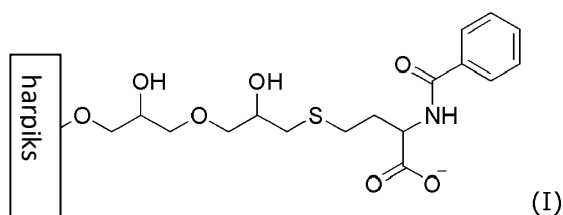
3. Framgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 eller 2, der den rekombinante alfa-mannosidasen oppnås ved hjelp av celler som er transisert med et nukleinsyrekonstrukt, og der nukleinsyrekonstruktet omfatter en nukleinsyresekvens valgt fra gruppen som består av:

i) nukleinsyresekvensen presentert i SEKV ID NR 1; og

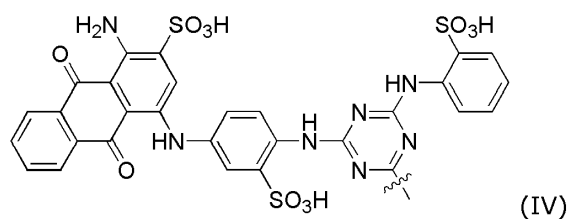
ii) en nukleinsyresekvens som koder for sekvensen presentert i SEKV ID NR 2 eller en undersekvens eller analog av sekvensen presentert i SEKV ID NR 2.

4. Framgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1–3, der fraksjonen av cellekulturen som omfatter den rekombinante humane lysosomale alfa-mannosidasen, er en klaret ufortynnet høsting.

5. Framgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1–4, der den harpiksbundne multimodale liganden er et stoff med formelen (I), (II) eller (III):



der R i stoffene med formelen (II) og (III) er en funksjonell gruppe med formelen (IV):



6. Framgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1–5, der et første eluat som omfatter rekombinant human lysosomal alfa-mannosidase, elueres fra harpiksen som omfatter en multimodal ligand ved hjelp av en vandig løsning som omfatter

etylenglykol eller propylenglykol.

7. Framgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1–6, der et første eluat som omfatter rekombinant human lysosomal alfa-mannosidase oppnådd fra harpiksen som omfatter en multimodal ligand, videre gjennomgår en framgangsmåte som omfatter trinnene å

- i) påføre en fraksjon som omfatter rekombinant human lysosomal alfa-mannosidase på en hydrofob-interaksjonskromatografi-harpiks for å tilveiebringe et eluat som omfatter den rekombinante humane lysosomale alfa-mannosidasen,
- ii) føre en fraksjon som omfatter rekombinant human lysosomal alfa-mannosidase gjennom en blandet-modus-ionebytteharpiks for å muliggjøre retensjon av kontaminasjoner for å tilveiebringe en gjennomstrømning som omfatter den rekombinante humane lysosomale alfa-mannosidasen; og
- iii) la en fraksjon som omfatter rekombinant human lysosomal alfa-mannosidase, gjennomgå kromatografi på en anionbytteharpiks for å tilveiebringe et eluat som omfatter den rekombinante humane lysosomale alfa-mannosidasen.

8. Framgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1–7, der den rekombinante humane lysosomale alfa-mannosidasen har en sekvens valgt blant:

- A) sekvensen presentert i SEKV ID NR 2,
- B) en sekvens som har minst 80 % sekvensidentitet med SEKV ID NR 2,
- C) en undersekvens av sekvensen i A) eller B).

9. Sammensetning som omfatter rensset rekombinant lysosomal alfa-mannosidase som kan oppnås ved hjelp av renseframgangsmåte ifølge krav 8, der minst 80 % av

alfa-mannosidasen er til stede som et 130 kDa glykoprotein.

10. Framgangsmåte for fed-batch- eller kontinuerlig framstilling av rekombinant human lysosomal alfa-mannosidase, som omfatter følgende trinn:

- a. å inokulere en framstillingsreaktor som omfatter et basismedium med celler som er i stand til å framstille rekombinant human lysosomal alfa-mannosidase på dag 0, for å tilveiebringe en cellekultur;
- b. å tilsette et feed-medium til cellekulturen minst én gang fra dag 1;
- c. å justere temperaturen i cellekulturen til maksimalt 35 °C, enten etter dag 3 eller når den levedyktige celletettheten er høyere enn 2,1 MVC/ml, det som inntreffer først.
- d. en renseframgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-8.

11. Framgangsmåte ifølge krav 10, der cellekulturen er vesentlig uten tilsetninger som er avledet fra dyr, så som torskeleveroljetilsetninger.

12. Framgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 10–11, der cellene er valgt fra gruppen som består av apenyre-CVI-linje transformert av SV40 (COS-7); human embryonisk nyrelinje (293 eller 293-celler som er underklonet for vekst i suspensjonskultur); babyhamster-nyreceller (BHK); eggstokkceller/-DHFR fra kinesisk dverghamster (CHO); Sertoli-celler fra mus (TM4); apenyreceller (CV 1); nyreceller fra afrikansk grønnape (VERO-76); humane livmorhalskarsinomceller (HELA); hundenyreceller (MDCK); leverceller fra bøffelrotte (BRL 3A); humane lungeceller (W138); humane leverceller (Hep G2, HB 8065); brystsvulst fra mus (MMT 060562); TRI-celler; MRC-5-celler; FS4-celler; og en human hepatomlinje (Hep G2).

13. Framgangsmåte ifølge krav 12, der trinn d) er en renseframgangsmåte som definert i krav 7.

14. Sammensetning som omfatter alfa-mannosidase som kan oppnås ved hjelp av framstillingsframgangsmåte ifølge krav 13, der minst 80 % av alfa-mannosidasen er til stede som et 130 kDa glykoprotein.

15. Sammensetning ifølge krav 9 eller krav 14, der den rekombinante alfa-mannosidasen forblir stabil i flytende løsning i minst 4 dager når den lagres ved +5 °C eller i minst 24 måneder når den lagres ved –20 °C.

16. Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 9, 14 eller 15, der alfa-mannosidasen har en sekvens valgt blant:

A) sekvensen presentert i SEKV ID NR 2,

B) en sekvens som har minst 80 % sekvensidentitet med SEKV ID NR 2,

C) en undersekvens av sekvensen i A) eller B).

17. Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 9 og 14–16 til bruk som legemiddel.

18. Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 9 og 14–16 til bruk i behandling av alfa-mannosidose.