



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3472314 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 9/64 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45) Translation Published 2021.10.04

(80) Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent 2021.05.05

(86) European Application Nr. 17814267.5

(86) European Filing Date 2017.06.19

(87) The European Application's Publication Date 2019.04.24

(30) Priority 2016.06.17, US, 201662351841 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

Designated Validation States: MA ; MD

(73) Proprietor Alexion Pharmaceuticals, Inc., 121 Seaport Boulevard, Boston, MA 02210, USA

(72) Inventor KARBARZ, Mark, c/o Portola Pharmaceuticals Inc.270 E. Grand Ave.Suite 22, South San Francisco, California 94080, USA
CONLEY, Pamela B., c/o Portola Pharmaceuticals Inc.270 E. Grand Ave.Suite 22, South San Francisco, California 94080, USA
LU, Genmin, c/o Portola Pharmaceuticals Inc.270 E. Grand Ave.Suite 22, South San Francisco, California 94080, USA

(74) Agent or Attorney TANDBERG INNOVATION AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54) Title **PREPARATION OF FACTOR XA DERIVATIVES**

(56) References Cited: WO-A1-2013/188587
WO-A1-2014/116275
US-A- 5 189 019
US-A- 5 589 571
US-A1- 2014 346 397
US-A1- 2015 025 011

SINHA U ET AL: "Expression, purification, and characterization of inactive human coagulation factor Xa (Asn³^2^2Ala⁴^1^9)", PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, vol. 3, no. 6, 1 December 1992 (1992-12-01), pages 518-524, XP024868176, ISSN: 1046-5928, DOI: 10.1016/1046-5928(92)90070-D [retrieved on 1992-12-01]

GENMIN LU ET AL: "A specific antidote for reversal of anticoagulation by direct and indirect inhibitors of coagulation factor Xa", NATURE MEDICINE, vol. 19, no. 4, 1 April 2013 (2013-04-01), pages 446-451, XP055066004, ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/nm.3102

JUSTESEN et al.: "Recombinant chymosin used for exact and complete removal of a prochymosin derived fusion tag releasing intact native target protein", Protein Science, vol. 18, no. 5, 16 March 2009 (2009-03-16) , pages 1023-1032, XP055580821, DOI: 10.1002/pro.112

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 et polypeptidprodukt uttrykt fra et
5 polynukleotidkonstrukt omfattende nukleinsyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 7 eller en nukleinsyresekvens som koder for en aminosyresekvens som har minst 90 % sekvensidentitet med aminosyresekvensen kodet av SEQ ID NO: 7, omfattende:
å tilsette et vaskemiddel til en prøve som inneholder et polypeptidprodukt uttrykt fra polynukleotidkonstruktet;
10 å tilsette prøven til en soyabønne-trypsininhibitor (STI)-basert affinitetskromatograf og eluere polypeptidet med en første elueringsbuffer for å generere en første eluert prøve, hvori den tilsatte prøven ikke inneholder et organisk løsningsmiddel;
å tilsette den første eluerte prøven til en ionebytterkromatograf og blandet moduskromatograf og eluere polypeptidet med en andre elueringsbuffer omfattende
15 minst 1M av et uorganisk salt for å generere en andre eluert prøve; og
å tilsette den andre eluerte prøven til en hydrofob interaksjonskromatograf og eluere polypeptidet med en tredje elueringsbuffer omfattende minst 2 mM natriumklorid, derved fremstille en rensset prøve omfattende polypeptidproduktet.
- 2.** Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori prøven som vaskemidlet tilsettes til inneholder polynukleotidkonstruktet og et polypeptidprodukt uttrykt fra polynukleotidkonstruktet.
- 3.** Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller krav 2, hvori ionebytter- og den blandede moduskromatografen omfatter en keramisk hydroksyapatittkromatograf av type I.
25
- 4.** Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori den andre elueringsbufferen omfatter minst 2M av det uorganiske saltet; hvori det uorganiske saltet fortrinnsvis er natriumklorid.
- 5.** Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori:
30 i) vaskemidlet omfatter Triton X-100 (polyetylenglykol p-(1,1,3,3-tetrametylbutyl)-fenyleter); og/eller
ii) den første elueringsbufferen omfatter 0,5M til 2M arginin; hvori fortrinnsvis den første elueringsbufferen har en pH på ca. 5 til 5,4; og/eller
35 iii) den hydrofobe interaksjonskromatografen omfatter en oktylsefarošekromatograf.

6. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, videre omfattende:

i) et rensetrinn med en anionbytterkromatograf; hvori fortrinnsvis

anionbytterkromatografen omfatter en Sartobind™-ionebyttermembran; og/eller

5 ii) å utsette én eller flere av prøvene for filtrering med et nanoflisfilter; hvori filtreringen med nanoflisfilteret fortrinnsvis er før prøven tilsettes den STI-baserte affinitetskromatografen.

7. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori den rensede

10 prøven inneholder mindre enn ca. 1 % av forurensende proteiner som ikke er uttrykt av polynukleotidkonstruktet.

8. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori

polypeptidproduktet uttrykkes i en celle som inneholder polynukleotidkonstruktet;

15 hvori cellen fortrinnsvis dyrkes i et medium under forhold for å fremstille minst 100 mg eller minst 200 mg av polypeptidproduktet per liter medium;

hvori mer foretrukket den rensede prøven inneholder (i) mer enn ca. 50 % av

polypeptidproduktet fremstilt i mediet eller (ii) mer enn ca. 100 mg av

polypeptidproduktet fra hver liters produksjon av mediet.

20

9. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori

polypeptidproduktet er et tokjedet polypeptid omfattende en lett kjede og en tung kjede.

10. Fremgangsmåten ifølge krav 9, hvori:

25 i) ca. 20 % til 50 % av polypeptidproduktet i den rensede prøven har:

(A) en tung kjede som består av aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 5; eller

(B) en tung kjede som består av aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 5; og ca. 5 %–

95 % av den tunge kjeden som består av aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 5 har

to O-bundede glykosyleringer og ca. 5 %–95 % av den tunge kjeden som består av

30 aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 5 har en O-bundet glykosylering;

og/eller

ii) ca. 40–80 % av polypeptidproduktet i den rensede prøven har:

(A) en tung kjede som består av aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 8; eller

(B) en tung kjede som består av aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 8; og minst

35 ca. 90 % av den tunge kjeden som består av aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 8

har en O-bundet glykosylering;

og/eller

- iii) ca. 2 %–12 % av polypeptidproduktet i den rensede prøven har en tung kjede som består av aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 9; og/eller
- iv) ca. 0,1 %–1,5 % av polypeptidproduktet i den rensede prøven har en tung kjede som består av aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 10; og/eller
- 5 v) ca. 2 %–8 % av polypeptidproduktet i den rensede prøven har en tung kjede som består av aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 11; og/eller
- vi) ca. 35 %–60 % av polypeptidproduktet i den rensede prøven har en lett kjede som består av aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 4.
- 10 **11.** Farmasøytisk sammensetning omfattende en farmasøytisk akseptabel bærer og en polypeptid av tokjedede polypeptider hvori:
- ca. 35 %–60 % av de tokjedede polypeptidene har en lett kjede som består av aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 4;
- ca. 20 %–60 % av de tokjedede polypeptidene har en tung kjede som består av
- 15 aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 5;
- ca. 40 %–60 % av de tokjedede polypeptidene har en tung kjede som består av aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 8; og
- mindre enn 10 % av de tokjedede polypeptidene har en tung kjede som består av aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 9.
- 20 **12.** Den farmasøytiske sammensetningen ifølge krav 11, hvori:
- i) mindre enn 5 % eller mindre enn 3 % av de tokjedede polypeptidene har en tung kjede som består av aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 9; og/eller
- ii) ca. 0,1 %–1,5 % av de tokjedede polypeptidene har en tung kjede som består av
- 25 aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 10; og/eller
- iii) ca. 2 %–8 % av de tokjedede polypeptidene har en tung kjede som består av aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 11.
- 13.** Den farmasøytiske sammensetningen ifølge krav 11 eller krav 12, hvori:
- 30 i) ca. 30 %–70 % av den tunge kjeden som består av aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 5 har to O-bundede glykosyleringer; og/eller
- ii) ca. 30 %–70 % av den tunge kjeden som består av aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 5 har en O-bundet glykosylering; og/eller
- iii) minst ca. 90 % av den tunge kjeden som består av aminosyresekvensen ifølge SEQ
- 35 ID NO: 8 har en O-bundet glykosylering.

14. Den farmasøytiske sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 11 til 13, hvori:

i) preparatet er lyofilisert; og/eller

ii) den farmasøytiske sammensetningen videre omfatter L-arginin-HCl eller

5 L-argininacetat; og/eller

iii) den farmasøytiske sammensetningen videre omfatter sukrose; og/eller

iv) den farmasøytiske sammensetningen videre omfatter mannitol.

15. Farmasøytisk sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 11 til 14 for
10 anvendelse ved reversering eller inhibering av antikoagulasjon hos en pasient som gjennomgår en antikoagulasjonsbehandling med en faktor Xa-inhibitor, anvendelsen omfattende administrering av sammensetningen til pasienten.