



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3510147 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.

C12N 9/10 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

C12P 19/64 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2023.10.02
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2023.05.17
(86)	European Application Nr.	17849497.7
(86)	European Filing Date	2017.09.07
(87)	The European Application's Publication Date	2019.07.17
(30)	Priority	2016.09.07, US, 201662384341 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
(73)	Proprietor	Rensselaer Polytechnic Institute, 110 8th Street, Troy, NY 12180-3590, USA
(72)	Inventor	DOUAISI, Marc, c/o Rensselaer Polytechnic Institute 110 8th Street, Troy, New York 12180-3590, USA GROVER, Navdeep, c/o Rensselaer Polytechnic Institute 110 8th Street, Troy, New York 12180-3590, USA DATTA, Payel, c/o Rensselaer Polytechnic Institute 110 8th Street, Troy, New York 12180-3590, USA PASKALEVA, Elena, c/o Rensselaer Polytechnic Institute 110 8th Street, Troy, New York 12180-3590, USA LIN, Lei, c/o Rensselaer Polytechnic Institute 110 8th Street, Troy, New York 12180-3590, USA BRODFUEHRER, Paul, c/o Rensselaer Polytechnic Institute 110 8th Street, Troy, New York 12180-3590, USA SIMMONS, Trevor J., c/o Rensselaer Polytechnic Institute 110 8th Street, Troy, New York 12180-3590, USA ONISHI, Akihiro, c/o Rensselaer Polytechnic Institute 110 8th Street, Troy, New York 12180-3590, USA HIRAKANE, Makoto, c/o Rensselaer Polytechnic Institute 110 8th Street, Troy, New York 12180-3590, USA FU, Li, c/o Rensselaer Polytechnic Institute 110 8th Street, Troy, New York 12180-3590, USA LI, Kevin, c/o Rensselaer Polytechnic Institute 110 8th Street, Troy, New York 12180-3590, USA LINHARDT, Robert J., c/o Rensselaer Polytechnic Institute 110 8th Street, Troy, New York 12180-3590, USA DORDICK, Jonathan, c/o Rensselaer Polytechnic Institute 110 8th Street, Troy, New York 12180-3590, USA MORI, Daisuke, c/o Rensselaer Polytechnic Institute 110 8th Street, Troy, New York 12180-3590, USA
(74)	Agent or Attorney	BRYN AARFLOT AS, Stortingsgata 8, 0161 OSLO, Norge

(54) Title **BIOSYNTHETIC HEPARIN**

(56) References

Cited:

US-A1- 2012 270 834

WO-A2-2014/204929

US-A1- 2009 197 308

US-A1- 2012 322 114

US-A1- 2014 349 962

BHASKAR UJJWAL ET AL: "Combinatorial one-pot chemoenzymatic synthesis of heparin", CARBOHYDRATE POLYMERS, APPLIED SCIENCE PUBLISHERS, LTD. BARKING, GB, vol. 122, 7 November 2014 (2014-11-07), pages 399-407, XP029150374, ISSN: 0144-8617, DOI: 10.1016/J.CARBPOL.2014.10.054

CHEN J ET AL: "Enzymatic redesigning of biologically active heparan sulfate", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 280, no. 52, 30 December 2005 (2005-12-30), pages 42817-42825, XP002609045, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M504338200

T C Laurent ET AL: "The molecular-weight-dependence of the anti-coagulant activity of heparin", The Biochemical journal, 1 November 1978 (1978-11-01), pages 691-701, XP055126709, ENGLAND DOI: 10.1042/bj1750691 Retrieved from the Internet:

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/743219>

Desai Umesh: "Measurement of Antithrombin III binding sites", , 1 January 1995 (1995-01-01), XP55779768, Retrieved from the Internet: URL:<http://www-heparin.rpi.edu/main/files/papers/130.pdf> [retrieved on 2021-02-25]

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. Et glykosaminoglykan innbefattende 78-99%, 81-97%, 83-95% eller 85-93%
5 av N-sulfatert (NS) disakkaridgruppe, idet glykosaminoglykanet har en
vektmidlere molekylvekt for å danne et endelig heparinprodukt på 15,000 –
19,000 Da, prosentandelen av heparinkjeder med en molekylvekt over 24,000
Da er ikke mer enn 20 % av totalen, og forholdet mellom kjeder mellom
molekylvekter på 8,000 til 16,000 til kjeder med molekylvekter på 16,000 til
10 24,000 Da er ikke mindre enn 1,0.
2. Et glykosaminoglykan innbefatter 44-80 %, 50-78 %, 55-77 % eller 60-76 %
av N-sulfaterte, 2-sulfaterte (NS2S) disakkaridgrupper og NS-
disakkaridgrupper, fortrinnsvis omfattende 13-39 %, 14- 35%, 15-30% eller 16-
15 26% av NS-gruppen, har glykosaminoglykanen en vektmidlere molekylvekt for å
danne et endelig heparinprodukt på 15,000- 19,000 Da, prosentandelen av
heparinkjeder med en molekylvekt på over 24,000 Da er ikke mer enn 20 % av
totalen, og forholdet mellom kjeder mellom molekylvekter på 8,000 til 16,000 til
kjeder med molekylvekter på 16,000 til 24,000 Da er ikke mindre enn 1,0.
20
3. Et glykosaminoglykan innbefattende 36-70 % N-sulfatert, 2-sulfatert, 6-
sulfatert (NS2S6S) disakkaridgruppe og 6-32 % N-sulfatert, 6-sulfatert (NS6S)
disakkaridgruppe, 40-67 % NS2S6S disakkarid gruppe og 6-26% av NS6S-
disakkaridgruppen, eller 43-64% av NS2S6S-disakkaridgruppen og 6-22% av
25 NS6S-disakkaridgruppen; og N-sulfatert, 2-sulfatert (NS2S) disakkaridgruppe
og N-sulfatert (NS) disakkaridgruppe, fortrinnsvis omfattende 0-27% av NS2S-
gruppen og 1-22% av NS-gruppen eller 12-27% av NS2S-gruppen og 1 -17 %
av NS-gruppen, glykosaminoglykanet har en vektmidlere molekylvekt for å
danne et endelig heparinprodukt på 15,000-19,000 Da, hvor prosentandelen av
30 heparinkjeder med en molekylvekt på over 24,000 Da er ikke mer enn 20 % av
totalen og forholdet mellom kjeder mellom molekylvekter på 8,000 til 16,000 og
kjeder med molekylvekter på 16,000 til 24,000 Da er ikke mindre enn 1,0.
4. Glykosaminoglykanet i henhold til krav 3, som ikke inneholder 3S-

disakkaridgrupper.

5. Fremgangsmåte for fremstilling av et biosyntetisk heparin, omfattende;

- a. erholde et glykosaminoglykan innbefattende 36-70% av NS2S6S-
5 disakkaridgruppen, 6-32% av NS6S-disakkaridgruppen, 0-27% av NS2S-
gruppen og 1-22% av NS-gruppen;
b. behandle glykosaminoglykanet med et enzym, som er 3-O-sulfotransferase
isoform 1 (3OST-1), i nærvær av en sulfatdonor for å fremstille en biosyntetisk
heparinbatch,
10 hvor glykosaminoglykanet har en vektmidlere molekylvekt for å danne et
endelig heparinprodukt på 15,000-19,000 Da, hvor prosentandelen av
heparinkjeder med en molekylvekt på over 24,000 Da ikke er mer enn 20% av
totalen, og forholdet mellom kjeder mellom molekylvekter på 8,000 til 16,000 til
kjeder med molekylvekter på 16,000 til 24,000 Da er ikke mindre enn 1,0.

15

6. Fremgangsmåten i henhold til krav 5, hvor i trinn (b) tilstrekkelig
glukosaminrester omdannes til 3-O-sulfoglukosaminrester slik at den produserte
porsjonen har anti-Xa- og anti-IIa-aktiviteter på ikke mindre enn 180 enheter/mg
og et anti- Xa/anti-IIa-forhold på 0,85-1,15; eller hvor anti-Xa/anti-IIa-forholdet er
20 0,9-1,1.

7. Fremgangsmåte for fremstilling av et andre glykosaminoglykan-
mellomprodukt innbefattende 44-80% av NS2S-gruppen og 13-39% av NS-
gruppen; hvilken fremgangsmåte omfatter:

- 25 c. konvertere en mengde N-acetylglukosaminrester i heparosan for å fremstille
et første glykosaminoglykan som omfatter 78-99 % av N-sulfatert (NS)
disakkaridgruppe, hvor mengden av de omdannede N-acetylglukosaminrestene
tilsvarer mengden av NS-gruppen i det første glykosaminoglykan-
mellomproduktet; og
30 d. behandle det første glykosaminoglykan-mellomproduktet med et enzym, som
er C5-epimerase (C5-epi) og 2-O-sulfotransferase (2OST), i nærvær av en
sulfatdonor for å fremstille det andre glykosaminoglykan-mellomproduktet,
hvor glykosaminoglykanet har en vektmidlere molekylvekt for å danne et
endelig heparinprodukt på 15,000-19,000 Da, hvor prosentandelen av

heparinkjeder med en molekylvekt på over 24,000 Da ikke er mer enn 20% av totalen, og forholdet mellom kjeder mellom molekylvekter på 8,000 til 16,000 til kjeder med molekylvekter på 16,000 til 24,000 Da som ikke er mindre enn 1,0.

- 5 **8.** Fremgangsmåten i henhold til krav 7, hvori nevnte omdannelse omfatter å reagere heparosanet med en base og et sulfoneringsreagens eller med N-deacetylase, N-sulfotransferase (NDST).

- 10 **9.** Fremgangsmåte for fremstilling av et tredje glykosaminoglykan-mellomprodukt som innbefatter 31-73% av NS2S6S-disakkaridgruppen, 6-40% av NS6S-disakkaridgruppen, 0-27% av NS2S-gruppen og 1-22% av NS-gruppen:

- hvilken fremgangsmåte omfatter å behandle et andre glykosaminoglykan-mellomprodukt som omfatter 44-80 % av NS2S-gruppen og 13-39 % av NS-gruppen med et enzym, som er 6-O-sulfotransferase-isoformene 1 og/eller 3 (6OST-1/3), i nærvær av en sulfatdonor for å konvertere det andre glykosaminoglykan-mellomproduktet til det tredje glykosaminoglykan-mellomproduktet,
- hvor glykosaminoglykanet har en vektmidlere molekylvekt for å danne et
- 20 endelig heparinprodukt på 15,000-19,000 Da, hvor prosentandelen av heparinkjeder med en molekylvekt på over 24,000 Da ikke er mer enn 20% av totalen, og forholdet mellom kjeder mellom molekylvekter på 8 000 til 16 000 til kjeder med molekylvekter på 16,000 til 24,000 Da som ikke er mindre enn 1,0.

- 25 **10.** Fremgangsmåten i henhold til hvilket som helst av kravene 5-9, hvor sulfatdonoren omfatter PAPS, fortrinnsvis hvor PAPS er i en løsning; hvor sulfatdonoren omfatter PAP og PNPS; hvor behandlingen utføres i nærvær av et resirkuleringssystem omfattende PAPS, PNPS og en katalysator, fortrinnsvis hvor katalysatoren er arylsulfotransferase IV (AST-IV); eller hvor nevnte
- 30 behandling utføres i en konstruert mikrobiell stamme som inneholder genene som koder for NDST, C5-Epi, 2OST, 3OST-1, en eller begge av 6OST-1 eller 6OST-3, og en kilde til PAPS.

11. Fremgangsmåten i henhold til hvilket som helst av kravene 5-9, hvor enzymet er i oppløsning eller immobilisert.