



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3585886 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.

C12N 9/12 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2024.02.19
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2023.11.22
(86)	European Application Nr.	18713747.6
(86)	European Filing Date	2018.02.27
(87)	The European Application's Publication Date	2020.01.01
(30)	Priority	2017.02.27, US, 201762464043 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; TN
(73)	Proprietor	Translate Bio, Inc., 200 West Street, Waltham, MA 02451, USA
(72)	Inventor	DIAS, Anusha, c/o Translate Bio, Inc. 29 Hartwell Avenue, Lexington, MA 02421, USA CRAWFORD, Daniel, c/o Translate Bio, Inc. 29 Hartwell Avenue, Lexington, MA 02421, USA DEROSA, Frank, c/o Translate Bio, Inc. 29 Hartwell Avenue, Lexington, MA 02421, USA ABYSALH, Jonathan, c/o Translate Bio, Inc. 29 Hartwell Avenue, Lexington, MA 02421, USA HEARTLEIN, Michael, c/o Translate Bio, Inc. 29 Hartwell Avenue, Lexington, MA 02421, USA
(74)	Agent or Attorney	RWS, Europa House, Chiltern Park, Chiltern Hill, SL99FG CHALFONT ST PETER, Storbritannia

(54)	Title	LARGE SCALE SYNTHESIS OF MESSENGER RNA
------	-------	---

(56)	References Cited:
------	-------------------

WO-A1-2016/149508, US-A1- 2016 326 575, WO-A1-2012/170930,
NAOHISA YOSHIOKA ET AL: "Efficient Generation of Human iPSCs by a Synthetic Self-Replicative RNA", CELL STEM CELL, vol. 13, no. 2, 1 August 2013 (2013-08-01) , pages 246-254, XP055228244, AMSTERDAM, NL ISSN: 1934-5909, DOI: 10.1016/j.stem.2013.06.001
anonymous: "RiboMAX(TM) Large Scale RNA Production Systems- SP6 and T7", Promega , 1 January 2017 (2017-01-01), pages 1-14, XP055470379, Ireland Retrieved from the Internet: URL:<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/ribomax-large-scale-rna-production-systems-sp6-and-t7-protocol.pdf> [retrieved on 2018-04-25]
S. Lee ET AL: "Tiny abortive initiation transcripts exert antitermination activity on an RNA hairpin-dependent intrinsic terminator", Nucleic Acids Research, vol. 38, no. 18, 1 October 2010 (2010-10-01), pages 6045-6053, XP055742462, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkq450

GONZALEZ-PEREZ I ET AL: "Scaling up in vitro transcription synthesis of RNA standards for competitive quantitative RT-PCR: Looking for bigger yields", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 385, no. 1, 1 February 2009 (2009-02-01), pages 179-181, XP025838534, ISSN: 0003-2697, DOI: 10.1016/J.AB.2008.10.009 [retrieved on 2008-10-11]

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 produksjon i stor skala av en terapeutisk sammensetning som er beriket for mRNA-molekyler i full lengde som koder for et peptid eller polypeptid av interesse for bruk ved levering til eller behandling av et subjekt, omfattende (i) syntetisering av mRNA in vitro ved hjelp av en SP6 RNA polymerase, og (ii) tailing av den syntetiserte mRNA-en, der den terapeutiske sammensetningen omfatter mindre enn 20 % abortive transkripter, og der minst 100 mg mRNA syntetiseres i én enkelt batch.
2. Fremgangsmåte i henhold til krav 1, der minst 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % av de syntetiserte mRNA-molekylene oppviser full lengde, eller der de syntetiserte mRNA-molekylene i det vesentlige oppviser full lengde.
3. Fremgangsmåte i henhold til krav 1, der sammensetningen omfatter mindre enn 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 % abortive transkripter, valgfritt når sammensetningen i det vesentlige er fri for abortive transkripter.
4. Fremgangsmåte i henhold til ett av de foregående kravene, der:
- a) transkriptene i full lengde eller de abortive transkriptene av mRNA detekteres ved elektroforese på agarosegel, valgfritt der mRNA denatureres av Glyoxal før elektroforesen på agarosegel ("elektroforese på Glyoxal-agarosegel"), valgfritt der den syntetiserte mRNA-en inneholder en ikke-detekterbar mengde abortive transkripter på elektroforese på Glyoxal-agarosegel, eller
- b) transkriptene i full lengde eller de abortive transkriptene av mRNA detekteres med kapillærelektroforese, valgfritt der kapillærelektroforesen er forbundet med
- i) en fluorescensbasert detektering, eller
- ii) en detektering med UV-absorpsjonsspektroskopi; valgfritt der den relative mengden transkripter i full lengde eller abortive transkripter av syntetisert mRNA bestemmes av de relative spissflatene som svarer til transkripter i full lengde eller abortive transkripter.
5. Fremgangsmåte i henhold til ett av de foregående kravene, der fremgangsmåten videre omfatter et trinn for å sette hette på den syntetiserte mRNA-en.

6. Fremgangsmåte i henhold til ett av de foregående kravene, der transkriptene i full lengde eller de abortive transkriptene av mRNA detekteres:

- a) før det settes hette på den syntetiserte mRNA-en, eller
- b) etter at det er satt hette på den syntetiserte mRNA-en.

5

7. Fremgangsmåte i henhold til ett av de foregående kravene, der:

- a) mRNA-molekylen i full lengde minst er 100 baser, 200 baser, 300 baser, 400 baser, 500 baser, 600 baser, 700 baser, 800 baser, 900 baser, 1 kb, 1,5 kb, 2 kb, 2,5 kb, 3 kb, 3,5 kb, 4 kb, 4,5 kb eller 5 kb i lengde, og/eller

- 10 b) mRNA-en syntetiseres ved en temperatur på mellom 37 og 42 °C.

8. Fremgangsmåte i henhold til ett av de foregående kravene, der:

- a) fremgangsmåten videre omfatter et trinn for å rense syntetisert mRNA for å fjerne abortive transkripter, eller

- 15 b) fremgangsmåten ikke inneholder et trinn for spesifikk fjerning av abortive transkripter.

9. Fremgangsmåte i henhold til ett av de foregående kravene, der:

- a) SP6 RNA-polymerasen er en naturlig forekommende SP6 RNA-polymerase, eller

- 20 b) SP6 RNA-polymerasen er en rekombinant SP6 RNA-polymerase, valgfritt der SP6 RNA-polymerasen omfatter en tag, valgfritt der tagen er en his-tag.

10. Fremgangsmåte i henhold til ett av de foregående kravene, der mRNA-en syntetiseres av SP6 RNA-polymerasen basert på en DNA-matrise, valgfritt der DNA-matrisen omfatter en SP6-promoter som er forbundet funksjonelt med en DNA-sekvens som koder for mRNA-sekvensen som skal syntetiseres, valgfritt der DNA-sekvensen er optimalisert, f.eks. for å redusere risikoen for at en hårnålsstruktur dannes i den syntetiserte mRNA-en.

25

11. Fremgangsmåte i henhold til ett av de foregående kravene, der mRNA-en syntetiseres i en reaksjonsblanding omfattende NTP-er i en konsentrasjon på 1 til 10 mM for hver NTP, DNA-matrisen i en konsentrasjon på 0,01 til 0,5 mg/ml og SP6 RNA-polymerasen i en konsentrasjon på 0,01 til 0,1 mg/ml, valgfritt der reaksjonsblandingen omfatter NTP-er i en konsentrasjon på 5 mM for hver NTP, DNA-matrisen i en konsentrasjon på 0,1 mg/ml og SP6 RNA-polymerasen i en konsentrasjon på 0,05 mg/ml, valgfritt der

35

- i) NTP-ene er naturlig forekommende NTP-er, eller
- ii) NTP-ene omfatter endrede NTP-er.

12. Fremgangsmåte i henhold til ett av de foregående kravene, der mRNA-en koder for:

a) human Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR);

b) human Ornithine Transcarbamylase (OTC) eller

5 c) human Retinoschisin 1 (hRS1).

13. Fremgangsmåte i henhold til ett av de foregående kravene, der mRNA-en er kodon-optimalisert.