



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3748358 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
G01N 33/50 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2024.03.25
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2023.12.27
(86)	European Application Nr.	20182629.4
(86)	European Filing Date	2015.11.23
(87)	The European Application's Publication Date	2020.12.09
(30)	Priority	2014.11.27, EP, 14195277
(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
(62)	Divided application	EP3120153, 2015.11.23
(73)	Proprietor	Gentium S.r.l., Piazza XX Settembre 2, 22079 Villa Guardia (Como), Italia
(72)	Inventor	IGNONI, Terenzio, Via Rigamonti 17/E, I-22020 San Fermo Della Battaglia (CO), Italia KUMAR, Vijay, Via Galilei 4, I-22070 Casnate (CO), Italia VERGA, Claudio, Via Beltramo 18, I-22070 Bregnano (CO), Italia
(74)	Agent or Attorney	AWA NORWAY AS, Postboks 1052 Hoff, 0218 OSLO, Norge

(54)	Title	CELLULAR-BASED METHOD FOR DETERMINING THE POTENCY OF DEFIBROTIDE
(56)	References Cited:	WO-A1-2013/190582 EISSNER GÜNTHER ET AL: "Fludarabine induces apoptosis, activation, and allogenicity in human endothelial and epithelial cells: protective effect of defibrotide.", BLOOD 1 JUL 2002, vol. 100, no. 1, 1 July 2002 (2002-07-01), pages 334-340, XP002738944, ISSN: 0006-4971 SCHROEDER H: "Defibrotide protects endothelial cells, but not L929 tumour cells, from tumour necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity", JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY, JOHN WILEY & SONS LTD, LONDON; GB, vol. 47, no. 3, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 250-252, XP008022870, ISSN: 0022-3573

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 å måle den biologiske aktiviteten til et prøveparti av defibrotid, omfattende:
 - 5 å dyrke pattedyrceller i kultur;
 å inkubere cellene med en løsning som inneholder minst ett cytotoksisk middel og minst én konsentrasjon av defibrotid fra prøvepartiet;
 å bestemme levedyktigheten til cellene etter en inkubasjonsperiode; å sammenligne cellelevedyktigheten med cellelevedyktigheten for et
 - 10 referanseparti av defibrotid og
 å beregne den biologiske aktiviteten til prøvepartiet av defibrotid basert på sammenligningen;
 hvori det minst ene cytotoksiske midlet har anti-metabolitt-, alkylende, nukleinsyreinterkalerende eller apoptotiske egenskaper.
 - 15
2. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori cellene inkuberes med det cytotoksiske midlet og minst fire forskjellige konsentrasjoner av defibrotid fra prøvepartiet, og hvori cellelevedyktigheten bestemmes for hver av konsentrasjonene for å skape en dose-responskurve.
- 20
3. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori cellelevedyktigheten målt for prøvepartiet av defibrotid sammenlignes med en kalibreringskurve oppnådd fra cellelevedyktighetsmålinger med referansepartiet av defibrotid.
- 25
4. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, hvori å beregne den biologiske aktiviteten til defibrotidprøvepartiet omfatter å bestemme et biologisk aktivitetsforhold i forhold til den biologiske aktiviteten til et referanseparti av defibrotid.
- 30
5. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4, hvori det cytotoksiske midlet som har anti-metabolittegenskap velges fra:
 - i) nukleobaseanaloger, nukleosid- og nukleotidanaloger, fortrinnsvis azatioprin, tiopuriner, fortrinnsvis tioguanin og merkaptopurin, fludarabin, pentostatin, 5-fluoruracil, 6-azauracil, klofarabin, nelarabin, kladribin,
 - 35 cytarabin, floksuridin, capecitabin, gemcitabin, azacidin og decitabin; eller
 - ii) antifolatforbindelser, fortrinnsvis metotreksat, aminopterin, pemetreksed, pralatreksat og raltitreksed.

6. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4, hvori det cytotoxiske midlet som har alkylerende egenskap velges fra:
- i) nitrogensenneper, fortrinnsvis mekloretamin, syklofosamid, melfalan, klorambucil, ifosfamid eller busulfan;
 - 5 ii) nitrosoureaer, fortrinnsvis N-Nitroso-N-metylurea, karmustin, lomustin, semustin, fotemustin eller streptozotocin;
 - iii) tetraziner, fortrinnsvis dakarbazin, mitozolomid eller temozolomid;
 - iv) aziridiner, fortrinnsvis tiotepa, mytomycin eller diaziquon; eller
 - v) cisplatiner, fortrinnsvis cisplatin, karboplatin eller oksaliplatin.
- 10
7. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4, hvori det cytotoxiske midlet som har nukleinsyreinterkalerende egenskap velges fra: etidiumbromid, mitomycin, aktinomycin, plikamycin, antrasykliner, fortrinnsvis daunorubicin, epirubicin, idarubicin, valrubicin eller mitoksantron, talidomid og
- 15 bleomiciner.
8. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4, hvori det cytotoxiske midlet som har apoptotiske egenskaper er:
- i) et anti-mikrotubulmiddel, fortrinnsvis vinkaalkaloider, fortrinnsvis vinkristin, 20 vinblastin, vinorelbin, vindesin og vinflunin eller taksaner, fortrinnsvis paklitaksel og docetaksel; eller
 - ii) en topoisomeraseinhibitor, fortrinnsvis irinotekan, topotekan, etoposid og teniposid.
- 25
9. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 8, hvori pattedyrcellene er humane endotelceller, humane epitelceller, sinusoidale endotelceller fra menneskelever eller humane mikrovaskulære endotelceller.
10. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9, hvori 30 pattedyrcellene er til stede i en tetthet på ca. 5×10^4 celler/ml til ca. 5×10^5 celler/ml.
11. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10, hvori den minst ene konsentrasjonen av defibrotid fra prøvepartiet er i området på ca. 1 35 $\mu\text{g/ml}$ til ca. $100 \mu\text{g/ml}$.
12. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 11, hvori inkubasjonsperioden er minst 24 timer, minst 48 timer eller minst 72 timer.

13. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 12, hvori å bestemme cellelevedyktighet omfatter å utføre en kolorimetrisk analyse basert på reduksjonen av tetrazoliumfargestoffer.
- 5 14. Fremgangsmåten ifølge krav 13, hvori tetrazoliumfargestoffet er 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid eller 2-(2-metoksy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium.
- 10 15. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 14, hvori å bestemme cellelevedyktighet omfatter å måle absorbansen til løsningen etter inkubering med cellene.
- 15 16. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 15, hvori prøvepartiet av defibrotid ekstraheres fra storfevev eller svinevev.
17. Fremgangsmåte for å fremstille en farmasøytisk sammensetning omfattende defibrotid, hvori fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 16 anvendes for å måle den biologiske aktiviteten til defibrotid for:
- 20 a) å justere mengden av defibrotid inkludert i sammensetningene for å sikre at sammensetningene omfatter nøyaktige og konsistente doser; og/eller
b) å måle den biologiske aktiviteten til forskjellige partier av defibrotid fremstilt på forskjellige lokasjoner, med forskjellige fremgangsmåter eller fra forskjellige kilder.
- 25 18. Fremgangsmåte for å overvåke stabiliteten til defibrotidpartier eller farmasøytiske sammensetninger omfattende defibrotid, hvori fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 16 anvendes for å måle den biologiske aktiviteten til defibrotid i partiet eller sammensetningen over tid; eventuelt hvori den biologiske aktiviteten til defibrotid måles: månedlig, halvårlig, årlig, etter
30 eksponering for ekstreme forhold for å overvåke aktiviteten til defibrotid, eller for å identifisere partier eller sammensetninger som har blitt forringet eller degradert.