



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 4269578 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 9/26 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2024.07.22
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2024.06.05
(86)	European Application Nr.	23191930.9
(86)	European Filing Date	2009.03.06
(87)	The European Application's Publication Date	2023.11.01
(30)	Priority	2008.03.06, US, 6862208 P
(84)	Designated Contracting States:	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 ; SE ; SI ; SK ; TR
	Designated Extension States:	AL ; BA ; RS
(73)	Proprietor	Halozyne, Inc., 12390 El Camino Real, San Diego, CA 92130, USA
(72)	Inventor	Baker, David, San Diego, CA, 92128, USA Bookbinder, Louis, San Diego, CA,, 92128, USA
(74)	Agent or Attorney	BRYN AARFLOT AS, Stortingsgata 8, 0161 OSLO, Norge

(54)	Title	SOLUBLE HYALURONIDASE COMPOSITION
(56)	References Cited:	US-A1- 2004 268 425

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. Sammensetning som omfatter en blanding av polypeptider, nevnte blanding omfatter polypeptidene angitt i SEKV ID NR: 4-8, hvori sammensetningen er oppnåelig ved følgende fremgangsmåte:

- a) å inokulere cellemedium i en bioreaktor med et inokulum av celler som koder for løselig rekombinant human PH20 (rHuPH20) for å produsere en cellekultur, hvori:
cellene omfatter mellom 150 og 300 kopier av nukleinsyre som koder for løselig rHuPH20;
bioreaktoren inneholder minst 100 liter cellekultur;
 10^{10} - 10^{11} celler inokuleres per 100 liter cellekultur; og
cellene dyrkes ved en innstilt temperatur;
- b) å mate cellene med et første tilførselsmedium som inneholder glukose, L-alanyl-L-glutamin, humant insulin og gjærekstrakt i mengder tilstrekkelig til å øke cellevekst og maksimal celletetthet, og for å øke løselig rHuPH20-syntese, hvori tilførselsmediet er tilsatt til kulturen i et volum på 0,5 % til 20 % av cellekulturvolumet;
- c) å mate cellene med et andre tilførselsmedium inneholdende glukose, L-alanyl-L-glutamin, gjærekstrakt og natriumbutyrat i mengder tilstrekkelig til å øke oppløselig rHuPH20-syntese og indusere cellesyklusstans (eng: cell cycle arrest); og
å senke temperaturen sammenlignet med temperaturen i trinn a) til en temperatur som er tilstrekkelig til å øke cellesyklusstans, øke cellelevedyktighet og stabilisere den løselige hyaluronidase; hvori:
mengden av L-alanyl-L-glutamin er redusert sammenlignet med mengden av L-alanyl-L-glutamin i trinn b);
mengden gjærekstrakt økes sammenlignet med mengden gjærekstrakt i trinn b); og
tilførselsmediet tilsettes til kulturen i et volum på 0,5 % til 20 % av cellekulturvolumet;
- d) å mate cellene med et tredje tilførselsmedium som inneholder glukose, L-alanyl-L-glutamin, gjærekstrakt og natriumbutyrat i mengder tilstrekkelig til å øke oppløselig rHuPH20-syntese og øke cellesyklusstans, og
å senke temperaturen sammenlignet med temperaturen i trinn c) til en temperatur som er tilstrekkelig til å øke cellesyklusstans, øke cellelevedyktighet og stabilisere den løselige hyaluronidase; hvori:
mengden av L-alanyl-L-glutamin er redusert sammenlignet med mengden av L-alanyl-L-glutamin i trinn c);
mengdene av gjærekstrakt, glukose og natriumbutyrat økes sammenlignet med mengdene av gjærekstrakt, glukose og natriumbutyrat i trinn c); og
tilførselsmediet tilsettes kulturen i et volum på 0,5 % til 20 % av cellekulturvolumet;
- e) å mate cellene med et fjerde tilførselsmedium som inneholder glukose, L-alanyl-L-glutamin, gjærekstrakt og natriumbutyrat i mengder tilstrekkelig til å øke oppløselig rHuPH20-syntese og øke cellesyklusstans, og
å senke temperaturen sammenlignet med temperaturen i trinn d) til en temperatur som er tilstrekkelig til å øke cellesyklusstans, øke cellelevedyktighet og stabilisere den løselige hyaluronidase; hvori:
mengden av L-alanyl-L-glutamin og glukose er redusert sammenlignet med mengden av L-alanyl-L-glutamin og glukose i trinn d);
mengden natriumbutyrat er redusert sammenlignet med mengden natriumbutyrat i trinn d); og
tilførselsmediet tilsettes til kulturen i et volum på 0,5 % til 20 % av cellekulturvolumet;
- f) å fortsette å dyrke cellene inntil levedyktigheten faller til under minst 50 %;

- g) å oppnå høstecellekulturfluidet; og
- h) å rense rHuPH20 fra høstecellekulturfluidet, hvori løselig rHuPH20 er en løselig form av humant PH20 som er rekombinant uttrykt i kinesisk hamsterovarie (CHO)-celler.

- 2.** Sammensetning ifølge krav 1, hvori temperaturen i trinn a) er 37 °C.
- 3.** Sammensetning ifølge krav 1 eller 2, hvori temperaturen i trinn c) er 36,5 °C.
- 4.** Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 1-3, hvori temperaturen i trinn d) er 36 °C.
- 5.** Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 1-4, hvori temperaturen i trinn e) er 35,5 °C.
- 6.** Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 1-5, hvori høstecellekulturfluidet filtreres før rensing.
- 7.** Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 1-6, hvori den løselige rHuPH20-rensingen utføres ved kolonnekromatografi.
- 8.** Sammensetning ifølge krav 7, hvori kolonnekromatografien omfatter perle-tverrbundet agarose-kolonnekromatografi (eng: beaded crosslinked agarose column chromatography), perle-tverrbundet fenyl-substituert agarose-kolonnekromatografi (eng: beaded crosslinked phenyl-substituted agarose column chromatography), aminofenylboronat-kolonnekromatografi og hydroksyapatitt-kolonnekromatografi.
- 9.** Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 1-8, hvori tilførselsmediet tilsettes kulturen i et volum på 4 % av cellekulturvolumet.
- 10.** Sammensetning ifølge krav 1, hvori:
 - i trinn a) dyrkes cellene ved 37 °C;
 - i trinn b) inneholder det første tilførselsmediet 33 g/L glukose, 32 mM L-alanyl-L-glutamin, 16,6 g/L gjærekstrakt og 33 mg/L insulin, og tilførselsmediet tilsettes kulturen i et volum på 4 % av cellekulturvolumet;
 - i trinn c) inneholder det andre tilførselsmediet 33 g/L glukose, 16 mM L-alanyl-L-glutamin, 33,4 g/L gjærekstrakt og 0,92 g/L natriumbutyrat, og tilførselsmediet tilsettes kulturen ved et volum på 4 % av cellekulturvolumet; og temperaturen senkes til 36,5 °C;
 - i trinn d) inneholder det tredje tilførselsmediet 50 g/L glukose, 10 mM L-alanyl-L-glutamin, 50 g/L gjærekstrakt og 1,8 g/L natriumbutyrat, og tilførselsmediet tilsettes kulturen ved et volum på 4 % av cellekulturvolumet; og temperaturen senkes til 36 °C;
 - i trinn e) inneholder det fjerde tilførselsmediet 33 g/L glukose, 6,6 mM L-alanyl-L-glutamin, 50 g/L gjærekstrakt og 0,92 g/L natriumbutyrat, og tilførselsmediet tilsettes kulturen ved et volum på 4 % av cellekulturvolumet; og temperaturen senkes til 35,5 °C; videre omfattende filtrering av høstecellekulturfluidet oppnådd i trinn g) og
 - i trinn h) rensing av rHuPH20 fra høstecellekulturfluidet ved bruk av perle-tverrbundet agarose-kolonnekromatografi, perle-tverrbundet fenyl-substituert agarose-kolonnekromatografi, aminofenylboronat-kolonnekromatografi eller hydroksyapatitt-kolonnekromatografi.
- 11.** Sammensetning ifølge krav 1, hvori:

i trinn a) inokuleres cellene med en celletetthet på 4×10^5 celler/mL; og cellene dyrkes ved 37 °C;

i trinn b) inneholder det første tilførselsmediet 33 g/L glukose, 32 mM L-alanyl-L-glutamin, 83,3 g/L gjærekstrakt og 33 mg/L insulin, og tilførselsmediet tilsettes kulturen i et volum på 4 % av cellekulturvolumet;

i trinn c) inneholder det andre tilførselsmediet 33 g/L glukose, 13 mM L-alanyl-L-glutamin, 166,7 g/L gjærekstrakt og 0,92 g/L natriumbutyrat, og tilførselsmediet tilsettes kulturen ved et volum på 4 % av cellekulturvolumet; og temperaturen senkes til 36,5 °C;

i trinn d) inneholder det tredje tilførselsmediet 50 g/L glukose, 10 mM L-alanyl-L-glutamin, 250 g/L gjærekstrakt og 1,8 g/L natriumbutyrat, og tilførselsmediet tilsettes kulturen ved et volum på 4 % av cellekulturvolumet; og temperaturen senkes til 36 °C;

i trinn e) inneholder det fjerde tilførselsmediet 33 g/L glukose, 6,7 mM L-alanyl-L-glutamin, 250 g/L gjærekstrakt og 0,92 g/L natriumbutyrat, og tilførselsmediet tilsettes kulturen ved et volum på 4 % av cellekulturvolumet; og temperaturen senkes til 35,5 °C; videre omfattende filtrering av høstecellekulturfluidet oppnådd i trinn g) og

i trinn h) rensing av rHuPH20 fra høstekulturfluidet ved bruk av perle-tverrbundet agarose-kolonnekromatografi, perle-tverrbundet fenyl-substituert agarose-kolonnekromatografi, aminofenylboronat-kolonnekromatografi eller hydroksyapatitt-kolonnekromatografi.

12. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 1-11, hvori minst 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 eller 40 gram løselig rHuPH20 produseres per 100 L cellekultur.

13. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 1-12, hvori den spesifikke aktiviteten til det løselige rHuPH20 er minst 80 000, 100 000, 120 000, 140 000, 160 000 eller 180 000 enheter/mg.

14. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 1-13, hvori volumet av cellekultur i bioreaktoren er 200, 300, 400, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 eller 3500 liter.

15. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 1-14, hvori cellene som koder for løselig rHuPH20 er DG44 CHO-celler.

16. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 1-15, hvori rHuPH20 er kodet av nukleinsyre angitt i SEKV ID NR:47.