(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO

(10) Identifikator dokumenta: **HR P20201757 T1**

HR P20201757 T1

(12) PRIJEVOD PATENTNIH ZAHTJEVA EUROPSKOG PATENTA

(51) MKP:
A61K 38/46 (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01)

(46) Datum objave prijevoda patentnih zahtjeva: 05.03.2021.

(21) Broj predmeta: P20201757T

(22) Datum podnošenja zahtjeva : 30.10.2020.

(96) Broj europske prijave patenta: EP 17192938.3
Datum podnošenja europske prijave patenta: 23.02.2011.

(97) Broj objave europske prijave patenta: EP 3281636 A1
Datum objave europske prijave patenta: 14.02.2018.

(97) Broj objave europskog patenta: EP 3281636 B1
Datum objave europskog patenta: 05.08.2020.

(31) Broj prve prijave: 201070067 (32) Datum podnošenja prve prijave: 24.02.2010. (33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: DK
307587 P 24.02.2010. US
(62) Broj i datum prvobitne prijave u slučaju podjele patenta: 11705806.5 23.02.2011.

(73) Nositelj patenta: **Chiesi Farmaceutici S.p.A., Via Palermo 26/A, 43122 Parma, IT**

(72) Izumitelji:
Jens Fogh, 3540 Lynge, DK
Claes Andersson, 187 43 Täby, SE
Cecilia Weigelt, 115 22 Stockholm, SE
Pia Hydén, 182 74 Stocksund, SE
Helena Reuterwall, 170 74 Solna, SE
Stefan Nilsson, 752 31 Uppsala, SE

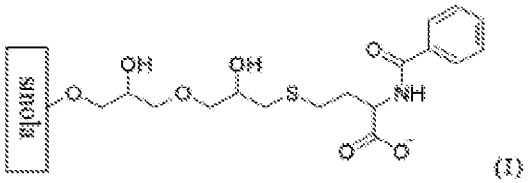
(74) Zastupnik: ZMP IP d.o.o., 10000 Zagreb, HR

(54) Naziv izuma: **POSTUPAK ZA PROIZVODNJU I PROČIŠĆAVANJE REKOMBINANTNE LIZOZOMSKE ALFA-MANOZIDAZE**

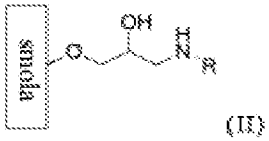
HR P20201757 T1

PATENTNI ZAHTJEVI

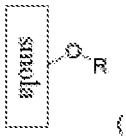
1. Postupak za pročišćavanje rekombinantne ljudske lizozomske alfa-manozidaze iz stanične kulture, gdje se frakcija navedene stanične kulture koja sadrži rekombinantnu ljudsku lizozomsku alfa-manozidazu podvrgava kromatografiji na smoli koja sadrži višemodalni ligand, pri čemu navedeni višemodalni ligand vezan za smolu predstavlja supstancu koja ima grupu karboksilne kiseline ili grupu sulfonske kiseline, i pri čemu je rezultat navedenog postupka pripravak koji sadrži pročišćenu alfa-manozidazu, **naznačen time što** je najmanje 80% alfa-manozidaze prisutno u vidu glikoproteina od 130 kDa.
2. Postupak prema patentnom zahtjevu 1, gdje stanična kultura sadrži stanice specifično dizajnirane za izražavanje rekombinantne alfa-manozidaze, pri čemu se navedene stanice biraju iz grupe koja se sastoji od CVI linije bubrega majmuna transformirane pomoću SV40 (COS-7); ljudske embrionalne linije bubrega (293 ili 293 sa subkloniranim stanicama tako da rastu u kulturi u suspenziji); stanica bubrega mladog hrčka (BHK); stanica jajnika kineskog hrčka /-DHFR (CHO); Sertolijevih stanica miša (TM4); stanica bubrega majmuna (CV I); stanica bubrega zelenog zamorca (VERO-76); ljudskih stanica cervikalnog karcinoma (HELA); stanica bubrega psa (MDCK); stanica jetre bivoljeg štakora (BRL 3A); ljudskih stanica pluća (W138); ljudskih stanica jetre (Hep G2, HB 8065); mišjeg tumora mliječnih žlijezda (MMT 060562); TRI stanica; MRC 5 stanica; FS4 stanica; i ljudske linije hepatoma (Hep G2).
3. Postupak prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 1 ili 2, gdje se rekombinantna alfa-manozidaza dobiva uporabom stanica transficiranih pomoću konstrukta nukleinske kiseline, i gdje navedeni konstrukt nukleinske kiseline sadrži sekvencu nukleinske kiseline odabranu iz grupe koja se sastoji od:
   i) sekvence nukleinske kiseline izložene u SEQ ID NO: 1; i
   ii) sekvence nukleinske kiseline koja kodira sekvencu izloženu u SEQ ID NO: 2 ili subsekvence ili analoga sekvence izložene u SEQ ID NO: 2.
4. Postupak prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 1-3, pri čemu navedena frakcija stanične kulture koja sadrži rekombinantnu ljudsku lizozomsku alfa-manozidazu predstavlja izbistreni nerazblaženi sakupljeni medij.
5. Postupak prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 1-4, gdje višemodalni ligand vezan za smolu predstavlja supstancu formule (I), (II) ili (III):



(I)

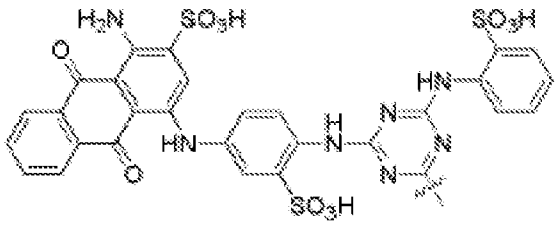


(II)



(III)

pri čemu R u supstancama formula (II) i (III) predstavlja funkcionalnu grupu formule (IV):



(IV)

6. Postupak prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 1-5, gdje se prvi eluat koji sadrži rekombinantnu ljudsku lizozomsku alfa-manozidazu eluira iz smole koja sadrži višemodalni ligand uporabom vodene otopine koja sadrži etilen glikol ili propilen glikol.
7. Postupak prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 1-6, gdje se prvi eluat koji sadrži rekombinantnu ljudsku lizozomsku alfa-manozidazu, dobiven iz smole koja sadrži višemodalni ligand, dalje podvrgava postupku koji sadrži korake

i) nanošenje frakcije koja sadrži rekombinantnu ljudsku lizozomsku alfa-manozidazu na kromatografsku smolu hidrofobnih interakcija kako bi se dobio eluat koji sadrži rekombinantnu ljudsku lizozomsku alfa-manozidazu,

ii) propuštanje frakcije koja sadrži rekombinantnu ljudsku lizozomsku alfa-manozidazu kroz ionsku izmjenjivačku smolu kombiniranog funkcioniranja kako bi se omogućilo zadržavanje onečišćenja, da bi se dobila propuštena frakcija koja sadrži rekombinantnu ljudsku lizozomsku alfa-manozidazu; i

iii) podvrgavanje frakcije koja sadrži rekombinantnu ljudsku lizozomsku alfa-manozidazu kromatografiji na anionskoj izmjenjivačkoj smoli, kako bi se dobio eluat koji sadrži rekombinantnu ljudsku lizozomsku alfa-manozidazu.

8. Postupak prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 1-7, pri čemu rekombinantna ljudska lizozomska alfa-manozidaza ima sekvencu izabranu od:
   A) sekvence izložene u SEQ ID NO 2,
   B) sekvence koja ima najmanje 80% identičnosti sekvence sa SEQ ID NO 2,
   C) podsekvence sekvence iz A) ili B).
9. Pripravak koji sadrži pročišćenu rekombinantnu lizozomsku alfa-manozidazu koju je moguće dobiti postupkom pročišćavanja prema patentnom zahtjevu 8, gdje je najmanje 80% alfa-manozidaze prisutno u vidu glikoproteina od 130 kDa.
10. Postupak za hranjenu šaržu ili kontinuiranu proizvodnju rekombinantne ljudske lizozomske alfa-manozidaze, koji sadrži sljedeće korake:
   a. cijepljenje proizvodnog reaktora koji sadrži bazalni medij stanica sposobnih da proizvode rekombinantnu ljudsku lizozomsku alfa-manozidazu na dan 0, kako bi se dobila stanična kultura;
   b. dodavanje napojnog medija navedenoj staničnoj kulturi najmanje jednom od prvog dana;
   c. podešavanje temperature navedene stanične kulture na najviše 35 °C, ili nakon dana 3 ili kada je gustoća održivih stanica viša od 2.1 MVC/mL, ovisno o tome što prvo nastupi.
   d. postupak pročišćavanja prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 1-8.
11. Postupak prema patentnom zahtjevu 10, gdje stanična kultura u osnovi ne sadrži bilo koje dodatke dobivene od životinja, kao što su dodaci iz ulja jetre bakalara.
12. Postupak prema bilo kojem od bilo kojih patentnih zahtjeva 10-11, pri čemu se stanice biraju iz grupe koja se sastoji od CVI linije bubrega majmuna transformirane pomoću SV40 (COS-7); ljudske embrionalne linije bubrega (293 ili 293 sa subkloniranim stanicama tako da rastu u kulturi u suspenziji); stanica bubrega mladog hrčka (BHK); stanica jajnika kineskog hrčka /-DHFR (CHO); Sertolijevih stanica miša (TM4); stanica bubrega majmuna (CV I); stanica bubrega zelenog zamorca (VERO-76); ljudskih stanica cervikalnog karcinoma (HELA); stanica bubrega psa (MDCK); stanica jetre bivoljeg štakora (BRL 3A); ljudskih stanica pluća (W138); ljudskih stanica jetre (Hep G2, HB 8065); mišjeg tumora mliječnih žlijezda (MMT 060562); TRI stanica; MRC 5 stanica; FS4 stanica; i ljudske linije hepatoma (Hep G2).
13. Postupak prema patentnom zahtjevu 12, gdje korak d) predstavlja postupak pročišćavanja definiran u patentnom zahtjevu 7.
14. Pripravak koji sadrži alfa-manozidazu, koju je moguće dobiti proizvodnim postupkom prema patentnom zahtjevu 13, pri čemu je najmanje 80% alfa-manozidaze prisutno kao glikoprotein od 130 kDa.
15. Pripravak prema patentnom zahtjevu 9 ili patentnom zahtjevu 14, gdje rekombinantna alfa-manozidaza ostaje stabilna u tekućoj otopini tokom najmanje 4 dana, kada se skladišti na +5 °C ili tokom najmanje 24 mjeseca kada se skladišti na -20 °C.
16. Pripravak prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 9, 14 ili 15, pri čemu alfa-manozidaza ima sekvencu izabranu od:
   A) sekvence izložene u SEQ ID NO 2,
   B) sekvence koja ima najmanje 80% identičnosti sekvence sa SEQ ID NO 2,
   C) podsekvence sekvence iz A) ili B).
17. Pripravak prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 9 i 14-16 za uporabu kao lijek.
18. Pripravak prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 9 i 14-16 za uporabu u liječenju alfa-manozidoze.