



(12) **Translation of
european patent specification**

(11) **NO/EP 2598516 B1**

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 1/36 (2006.01)
C07K 14/245 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2015.07.20
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2015.03.25
(86)	European Application Nr.	11745810.9
(86)	European Filing Date	2011.07.27
(87)	The European Application's Publication Date	2013.06.05
(30)	Priority	2010.07.27, GB, 201012599
(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
(73)	Proprietor	UCB Biopharma SPRL, 60, Allée de la Recherche, 1070 Brussels, BE-Belgia
(72)	Inventor	WILD, Gavin, Barry, IPD, UCB Celltech208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE, GB-Storbritannia
(74)	Agent or Attorney	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54) Title **PROCESS FOR PURIFYING PROTEINS**

(56) References
Cited:

WO-A1-2011/086138
WO-A1-2011/086139
WO-A1-2011/086141
HU ET AL: "Optimisation of production of a domoic acid-binding scFv antibody fragment in Escherichia coli using molecular chaperones and functional immobilisation on a mesoporous silicate support", PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, vol. 52, no. 1, 8 January 2007 (2007-01-08), pages 194-201, XP005758623, ISSN: 1046-5928, DOI: 10.1016/J.PEP.2006.08.009
HU ET AL: "Cloning, expression and characterisation of a single-chain Fv antibody fragment against domoic acid in Escherichia coli", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 120, no. 1, 17 October 2005 (2005-10-17), pages 38-45, XP005097884, ISSN: 0168-1656, DOI: 10.1016/J.JBIOTEC.2005.05.018

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

- 5 **1.** Fremgangsmåte for rensing av et rekombinant protein fra en gram-negativ bakterie-
vertscelleprøve eller et ekstrakt derav, karakterisert ved at vertscellen uttrykker et
rekombinant protein, og en rekombinant disulfid-isomerase DsbC; hvor
fremgangsmåten omfatter:
- 10 a) justering av pH-verdien i vertscelleprøven eller et ekstrakt derav til en pH på 5
eller lavere for å utfelle den rekombinante disulfid-isomerase; og
b) separering av utfelt rekombinant-disulfid-isomerase fra det rekombinante
protein for å produsere en rekombinant proteinprøve.
- 15 **2.** Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at pH-verdien til vertscelleprøven
eller ekstraktet derav er justert til en pH på 4,5 eller lavere.
- 3.** Fremgangsmåte ifølge krav 2, karakterisert ved at pH-verdien i vertscelleprøve eller
et ekstrakt derav er justert til en pH på 4,5 til 3,0.
- 20 **4.** Fremgangsmåte ifølge krav 2, karakterisert ved at pH-verdien i vertscelleprøve eller
et ekstrakt derav er justert til en pH på 3 eller lavere.
- 5.** Fremgangsmåte ifølge krav 4, karakterisert ved at i trinn a) er vertscelle-dipeptid-
25 bindende protein ytterligere utfelt, og i trinn b) er vertscelle-dipeptid-bindende protein
videre adskilt fra det rekombinante protein.
- 6.** Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de foregående krav, karakterisert ved at
disulfid-isomerasen omfatter en histidin-tag.
- 30 **7.** Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de foregående krav, karakterisert ved at
den gram-negative bakterievertscelle er *E. coli*.
- 8.** Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de foregående krav, karakterisert ved at
35 vertscellen omfatter Fkpa og/eller Skp.

9. Fremgangsmåte som angitt i hvilket som helst foregående krav, karakterisert ved at i trinn a) er pH-verdien i vertscelleprøven eller ekstrakt derav justert til en pH lavere enn 5 ved hjelp av iseddik.

5 **10.** Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de foregående krav, karakterisert ved at vertscelleprøve eller et ekstrakt derav holdes ved en pH på 5 eller lavere i én time eller mindre.

10 **11.** Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de foregående krav, karakterisert ved at separeringen i trinn b) omfatter sentrifugering og/eller filtrering.

12. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de foregående krav, karakterisert ved at etter trinn b) omfatter fremgangsmåten med et ytterligere rensetrinn ved å underkaste den rekombinante proteinprøven for kromatografi.

15 **13.** Fremgangsmåte ifølge krav 11, karakterisert ved at kromatografien er ionebytter-kromatografi.

20 **14.** Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de foregående krav, karakterisert ved at etter trinn b) er pH-verdien av den rekombinante proteinprøven justert til en pH på 5 til 7.

25 **15.** Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst foregående krav, karakterisert ved at før trinn a) tilsettes ekstraksjonsbufferen til vertscelleprøven eller et ekstrakt derav og vertscelleprøven eller et ekstrakt derav underkastes et varmebehandlingstrinn.

16. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de foregående krav, karakterisert ved at det rekombinante proteinet har en pI på 6 til 9.

30 **17.** Fremgangsmåte som angitt i krav 16, karakterisert ved at det rekombinante proteinet har en pI på 8 til 9.

18. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de foregående krav, karakterisert ved at det rekombinante protein er et rekombinant antistoff.

35

19. Fremgangsmåte ifølge krav 18, karakterisert ved at det rekombinante antistoffet er et monoklonalt, humanisert eller kimært antistoff, eller et fragment derav, slik som et bindende fragment derav.

5 **20.** Fremgangsmåte ifølge krav 18 eller krav 19, karakterisert ved at det rekombinante antistoffet er et Fab- eller Fab'-fragment.

21. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 18 til 20, karakterisert ved at det rekombinante antistoffet er spesifikt for human TNFa.

10

22. Fremgangsmåte ifølge krav 21, karakterisert ved at antistoffet omfatter en tungkjede hvor det variable domenet omfatter et CDR som har sekvensen angitt i SEQ ID NO: 1 for CDRH1, SEQ ID NO: 2, for CDRH2 og SEQ ID NO: 3 for CDRH3, og en lettkjede hvor det variable domenet omfatter et CDR som har sekvensen angitt i
15 SEQ ID NO: 4 for CDRL1, SEQ ID NO: 5 for CDRL2 og SEQ ID NO: 6 for CDRL3.

23. Fremgangsmåte som angitt i krav 22, karakterisert ved at antistoffet omfatter den lettkjede-variable region-sekvensen angitt i SEQ ID NO: 7 og den tungkjede-variable regionen angitt i SEQ ID NO: 8.

20

24. Fremgangsmåte som angitt i krav 23, karakterisert ved at antistoffet er et Fab-fragment, og omfatter en tungkjede som har sekvensen angitt i SEQ ID NO: 10 og en lettkjede som har sekvensen angitt i SEQ ID NO: 9.

25 **25.** Anvendelse av et trinn for justering av pH i en gram-negativ bakterievertscelleprøve eller ekstrakt derav, transformert med en ekspresjonsvektor som koder for et rekombinant protein til en pH på 5 eller lavere for å utfelle vertscelle-rekombinant disulfid-isomerase, skille den utfelte vertscelle-rekombinante disulfid-isomerasen fra det rekombinante protein, og produsere en renset rekombinant proteinprøve.

30