



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2632944 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 14/53 (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01)
C12N 15/27 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2017.11.27
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2017.06.21
(86)	European Application Nr.	11836621.0
(86)	European Filing Date	2011.10.26
(87)	The European Application's Publication Date	2013.09.04
(30)	Priority	2010.10.29, KR, 20100106994
(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
(73)	Proprietor	Hanmi Science Co., Ltd., 550 Dongtangiheungno Dongtan-myeon, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-813, KR-Sør-Korea
(72)	Inventor	CHOI, Sung Chul, 331-1604 Cheongmyeongmaeul Byeoksan Apt.Yeongtong-dongYeongtong-gu, Suwon-siGyeonggi-do 443-470, KR-Sør-Korea KIM, Jin Ki, 209-1104 Jugong Apt.Gunmun-dong, Pyeongtaek-siGyeonggi-do 450-706, KR-Sør-Korea OH, Young Hak, 203-1504 Cheonggu Apt.Omokcheon-dongGwonseon-gu, Suwon-siGyeonggi-do 441-757, KR-Sør-Korea LEE, Jong Soo, 310-1601 Cheongsolmaeul Halla Apt.Geumgok-dongBundang-gu, Seongnam-siGyeonggi-do 463-725, KR-Sør-Korea
(74)	Agent or Attorney	Curo AS, Vestre Rosten 81, 7075 TILLER, Norge

(54)	Title	METHOD FOR PURIFYING HUMAN GRANULOCYTE-COLONY STIMULATING FACTOR FROM RECOMBINANT E. COLI
(56)	References Cited:	EP-A2- 1 837 346, US-A1- 2007 004 904, US-A1- 2008 260 684 VANZ ET AL.: 'Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization' MICROBIAL CELL FACTORIES vol. 7, 04 April 2008, page 13, XP021036424 ZAVECKAS ET AL.: 'Mutation of surface-exposed histidine residues of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor (Cys17Ser) impacts on interaction with chelated metal ions and refolding in aqueous two-phase systems' JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B vol. 786, 2003, pages 17 - 32, XP004414360 LASNIK ET AL.: 'Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF) expressed by methylotrophic yeast Pichia pasforis' PFLUGERS ARCHIV-EUROPEAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY vol. 442, 2001, pages R184 - R186, XP008023510 BAE ET AL.: 'Improved process for production of recombinant yeast-derived monomeric human G-CSF' APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY vol. 52, 1999, pages 338 - 344, XP002515608

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 rense human granulocyt-kolonistimulerende faktorer (hG-CSFs) fra en rekombinant *E. coli* med høyt utbytte, omfattende trinnene å:
 - (a) dyrke en hG-CSF uttrykkende rekombinant *E. coli* for å oppnå en cellepellet ved sentrifugering;
 - (b) separere en hG-CSF inneholdende supernatant fra cellepelletten oppnådd i trinn (a);
 - (c) behandle supernatanten oppnådd i trinn (b) med en syre for å separere det resulterende presipitat ved filtrering;
 - (d) benytte filtratet oppnådd i trinn (c) til kationbytte-kromatografi;
 - (e) benytte eluatet oppnådd i trinn (d) til hydrofobinteraksjon-kromatografi; og
 - (f) benytte eluatet oppnådd i trinn (e) til anionbytte-kromatografi.
2. Fremgangsmåte i samsvar med patentkrav 1, idet hG-CSFs i trinn (a) er uttrykt inn i periplasmaet av rekombinant *E. coli*.
3. Fremgangsmåte i samsvar med patentkrav 2, idet det rekombinante *E. coli* er en eller flere valgt fra gruppen bestående av *E. coli* BL21(DE3)/pT14SS1SG(HM 10310), *E. coli* BL21(DE3)/pT14SS1S17SEG(HM 10311; Accession No. KCCM-10154), *E. coli* BL21(DE3)/pTO1SG(HM 10409), *E. coli* BL21(DE3)/pTO1S17SG(HM 10410; Accession No. KCCM-10151), *E. coli* BL21(DE3)/pTO17SG(HM 10411; Accession No. KCCM-10152), *E. coli* BL21(DE3)/pTO17TG(HM 10413), *E. coli* BL21(DE3)/pTO17AG(HM 10414), *E. coli* BL21(DE3)/pTO17GG(HM 10415), *E. coli* BL21(DE3)/pBAD2M3VG(HM 10510; Accession No. KCCM-10153), *E. coli* BL21(DE3)/pBAD17SG(HM 10511) og *E. coli* BL21(DE3)/pBAD2M3V17SG(HM 10512).
4. Fremgangsmåte i samsvar med patentkrav 1, idet den hG-CSF inneholdende supernatant i trinn (b) blir separert fra cellepelletten ved osmotisk ekstraksjon.
5. Fremgangsmåte i samsvar med patentkrav 4, idet den osmotiske ekstraksjon blir utført ved å behandle cellepelletten med en 10% til 30% sukkroseinneholdende bufferløsning for å oppnå en cellepellet ved sentrifugering, tilsette destillert vann til cellepelletten og deretter utføre sentrifugering.
6. Fremgangsmåte i samsvar med patentkrav 1, idet pH av supernatanten i trinn (c) blir regulert til 5,0 – 5,8 ved syrebehandling.
7. Fremgangsmåte i samsvar med patentkrav 1, idet syren i trinn (c) er valgt fra gruppen bestående av eddiksyre, fosforsyre og sitronsyre.
8. Fremgangsmåte i samsvar med patentkrav 1, idet kationbytte-kromatografien i trinn (d) blir utført ved bruk av en kolonne valgt fra gruppen bestående av sefarose, sefadex, agarose, sefacel, polystyren, polyakrylat, cellulose og toyoperl.
9. Fremgangsmåte i samsvar med patentkrav 8, idet kationbytte-kromatografien i trinn (d) blir utført ved bruk av en SP-sefarose kolonne.
10. Fremgangsmåte i samsvar med patentkrav 1, idet kationbytte-kromatografien i trinn (d) blir utført ved bruk av en eddiksyreinneholdende bufferløsning innenfor et pH-område fra pH 4,0 til 6,0 med en saltkonsentrasjon fra 200 til 500 mM.
11. Fremgangsmåte i samsvar med patentkrav 10, idet kationbytte-kromatografien i trinn (d) blir utført ved bruk av en bufferløsning inneholdende 200 til 500 mM natriumklorid og 5- til 20 mM natriumacetat, ved pH 5,0 til 6,0.

12. Fremgangsmåte i samsvar med patentkrav 1, idet hydrofobinteraksjon-kromatografien i trinn (e) blir utført ved bruk av en sefarose, Bio-Gel A eller Minileak-kolonne med en funksjonell gruppe valgt fra gruppen bestående av propyl, butyl, pentyl, heksyl, heptyl and oktyl, isoalkyl, neoalkyl, og oligoetylenglykol.
13. Fremgangsmåte i samsvar med patentkrav 12, idet hydrofobinteraksjon-kromatografien i trinn (e) blir utført ved bruk av en butyl-sefarosekolonne.
14. Fremgangsmåte i samsvar med patentkrav 1, idet hydrofobinteraksjon-kromatografien i trinn (e) blir utført ved bruk av en bufferløsning innenfor pH-området fra pH 7,0 til 8,5 med en saltkonsentrasjon fra 0 til 100 mM.
15. Fremgangsmåte i samsvar med patentkrav 14, idet hydrofobinteraksjon-kromatografien i trinn (e) blir utført ved bruk av en bufferløsning inneholdende 5 til 20 mM Tris ved pH 7,0 til 8,0.
16. Fremgangsmåte i samsvar med patentkrav 1, idet anionbytte-kromatografien i trinn (f) blir utført ved bruk av en kolonne valgt fra gruppen bestående av Q-sefarose, Macro-Prep Q, Q-HyperD, og Fractogel EMD-TMAE 650.
17. Fremgangsmåte i samsvar med patentkrav 16, idet anionbytte-kromatografien i trinn (f) blir utført ved bruk av en Q-sefarose kolonne.
18. Fremgangsmåte i samsvar med patentkrav 1, idet anionbytte-kromatografien i trinn (f) blir utført ved bruk av en bufferløsning innenfor et pH-område fra pH 6,5 til 8,5 med en saltkonsentrasjon fra 100 til 300 mM.
19. Fremgangsmåte i samsvar med patentkrav 18, idet anionbytte-kromatografien i trinn (f) blir utført ved bruk av en bufferløsning inneholdende 100 til 300 mM natriumklorid, 5 til 20 mM Tris og 50 til 200 mM urea ved pH 7,0 til 8,0.