



(12) Translation of
european patent specification

(11) NO/EP 2672984 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 38/18 (2006.01)
C07K 14/48 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2015.10.26
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2015.05.27
(86)	European Application Nr.	12805695.9
(86)	European Filing Date	2012.12.19
(87)	The European Application's Publication Date	2013.12.18
(30)	Priority	2011.12.19, EP, 11194208
(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	Wacker Chemie AG, Hanns-Seidel-Platz 4, 81737 München, DE-Tyskland
(72)	Inventor	LOREY, Susan, Scil Proteins GmbHHeinrich-Damerow-Strasse 1, 06120 Halle/Saale, DE-Tyskland JANOWSKI, Bernhard, Scil Proteins GmbHHeinrich-Damerow-Strasse 1, 06120 Halle/Saale, DE-Tyskland PULTKE, Heiko, Scil Proteins GmbHHeinrich-Damerow-Strasse 1, 06120 Halle/Saale, DE-Tyskland KATHMANN, Daniela, Scil Proteins GmbHHeinrich-Damerow-Strasse 1, 06120 Halle/Saale, DE-Tyskland PARTHIER, Antje, Scil Proteins GmbHHeinrich-Damerow-Strasse 1, 06120 Halle/Saale, DE-Tyskland ANTON, Andreas, Scil Proteins GmbHHeinrich-Damerow-Strasse 1, 06120 Halle/Saale, DE-Tyskland
(74)	Agent or Attorney	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Title	NOVEL PRONGF MUTANTS AND USES THEREOF IN THE PRODUCTION OF BETA-NGF
(56)	References Cited:	EP-A1- 2 135 951 WO-A2-2005/068498 US-A1- 2008 050 776

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. En proNGF-mutant hvor proteasespaltningssete $R^1SK^3R^4$ er substituert i posisjon R^1 og K^3 svarende til posisjon 101 og 103 av den humane villtype proNGF-sekvensen (SEQ ID NO: 1) med valin i posisjon 101 og med alanin i posisjon 103.

2. proNGF-mutant ifølge krav 1, hvor mutanten er fremstilt ved rekombinant ekspresjon i prokaryote celler, fortrinnsvis ved rekombinant ekspresjon i *E. coli*.

3. Fremgangsmåte for fremstilling av en biologisk aktiv human beta-NGF, omfattende

- (i) tilveiebringning en proNGF-mutant i samsvar med krav 1 eller 2, og
- (ii) spalting av proNGF-mutanten for å oppnå aktiv human beta-NGF.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 3, omfattende følgende trinn:

- a. oppløsning av proNGF-mutant i samsvar med krav 1 eller 2 ved solubilisering av inklusjonslegemer i en denaturerende løsning;
- b. overføring av proNGF-mutanten inn i en refoldingsløsning hvor den denaturerte proNGF inntar en biologisk aktiv konformasjon,
- c. rensing av den refoldede proNGF-mutanten,
- d. spalting av pro-sekvensen til proNGF-mutanten for å oppnå den aktive beta-NGF.

5. Fremgangsmåte ifølge krav 4,

- hvor den denaturerende løsning omfatter en løsning som inneholder (i) en kaotropisk substans, (ii) en chelator, (iii) en buffer og (iv) et reduksjonsmiddel, fortrinnsvis hvor den denaturerende løsningen omfatter

- i. 1 - 8 M Guanidinium-HCl, fortrinnsvis 4-6 M,
- ii. 0,01 til 1 M Tris,
- iii. 1-50 mM EDTA,
- iv. 1-100 mM valgt fra glutation (GSH) eller cystein,
- v. pH 7,0 - 10,0,

og mer foretrukket omfatter

- i. 4 M Guanidinium-HCl,
- ii. 0,1 M Tris,
- iii. 10 mM EDTA
- iv. 5 mM GSH eller cystein
- v. pH 8,0, eller

- hvor den refoldende løsning omfatter

- i. 0,5-1,0 M av en chaperone,
- ii. 1- 10 mM av en metall-chelator,
- iii. 0,1 -10 mM av et redoks-shuffling system,
- iv. pH 8,0 - pH 11,0,

fortrinnsvis, hvor den refoldende løsningen omfatter

- i. 0,75 M Arginin,
- ii. 5 mM EDTA
- iii. 1 mM L-cystin og 5 mM L-cystein, eller 1 mM GSSG (oksidert glutation)
- iv. pH 9,5.

6. Fremgangsmåte ifølge krav 4 eller 5, hvor refoldingen utføres som en puls renaturering, fortrinnsvis hvor, i forhold til det endelige refoldingsvolumet under puls renaturering, konsentrasjonen av Guanidinium HCl ikke overstiger 0,3 M og proteinkonsentrasjonen per puls ikke bør overskride 50 ug/ml.

7. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 4-6, hvor proNGF-mutanten renses ved blandet modus kromatografi, hvor kromatografikolonnen fortrinnsvis er en blandet modus-materialkolonne med en syntetisk affinitetsligand, mer foretrukket en kolonne med 4-merkapto-etyl-pyridin (MEP), heksylamino (HEA), fenylpropylamino (PPA), 2-merkapto-5- benzamidazolsulfosyre (MBI), Capto MMC (GEHC), N-benzyl-N-metyl-etanolamin (GEHC), CHT-hydroksyapatitt eller CHT-fluorapatitt, mest foretrukket 4-merkapto-etyl-pyridin (MEP).

8. Fremgangsmåte ifølge et av kravene 4-7, hvor pro-formen av proNGF-mutanten spaltes av en protease, fortrinnsvis av en serinprotease, mer foretrukket av trypsin.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 8, hvor forholdet av trypsin til proNGF-mutant er fra 1 : 200 – 1 : 100.000, fortrinnsvis fra 1 : 5.000 – 1 : 20.000, og mer foretrukket er på 1 : 10.000 (v/v).

5 **10.** Fremgangsmåte ifølge krav 4 til 9, videre omfattende et ytterligere trinn med rensing av beta-NGF, fortrinnsvis ved hjelp av kolonnekromatografi, mer foretrukket med SP-Sepharose HP-kolonne.

10 **11.** Anvendelse av en proNGF-mutant ifølge et av kravene 1 eller 2, for fremstilling av human beta-NGF.