



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2828287 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 14/535 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2018.04.03
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2018.01.17
(86)	European Application Nr.	13709470.2
(86)	European Filing Date	2013.03.18
(87)	The European Application's Publication Date	2015.01.28
(30)	Priority	2012.03.19, HU, P1200172
(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	Richter Gedeon Nyrt., Gyömrői út 19-21, 1103 Budapest, HU-Ungarn
(72)	Inventor	FELFÖLDI, Ferenc, Jósika str. 25. II/18, H-1077 Budapest, HU-Ungarn BALLAGI, Andras, Galgóczy u. 1-3, H-1125 Budapest, HU-Ungarn BÉCSI, János, Mester str. 36. IV/12, H-1095 Budapest, HU-Ungarn
(74)	Agent or Attorney	BRYN AARFLOT AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Title	METHODS FOR REFOLDING G-CSF FROM INCLUSION BODIES
(56)	References Cited:	WO-A1-87/01132, WO-A1-89/10932, WO-A1-98/53072, ANNA NORDBORG ET AL: "Recent advances in polymer monoliths for ion-exchange chromatography", ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 394, no. 1, 11 February 2009 (2009-02-11), pages 71-84, XP019702659, ISSN: 1618-2650, RASOUL KHALILZADEH ET AL: "Process development for production of human granulocyte-colony stimulating factor by high cell density cultivation of recombinant Escherichia coli", JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY ; OFFICIAL JOURNAL OF THE SOCIETY FOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 35, no. 12, 6 August 2008 (2008-08-06), pages 1643-1650, XP019637503, ISSN: 1476-5535, DOI: 10.1007/S10295-008-0408-8, BARUT M ET AL: "Methacrylate-based short monolithic columns: Enabling tools for rapid and efficient analyses of biomolecules and nanoparticles", JOURNAL OF SEPARATION SCIENCE, WILEY, DE, vol. 31, no. 11, 1 June 2008 (2008-06-01), pages 1867-1880, XP002513132, ISSN: 1615-9306, DOI: 10.1002/JSSC.200800189, WO-A1-2004/001056

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 refolde granulocytkolonistimulerende faktor (G-CSF) fra inklusjonslegemer, omfattende å:

- 5 a) løse opp G-CSF i nærvær av et oppløsningsmiddel;
- b) utføre et oksidasjons- og første refoldingstrinn, omfattende inkubering av det oppløste G-CSF i nærvær av et oksidasjonsmiddel og oppløsningsmiddelet;
- c) fjerne oppløsningsmiddelet ved ionebytterharpiksadsorpsjon og/eller ionebyttekromatografi og eventuelt utføre en sur utfelling; og
- 10 d) utføre et andre refoldingstrinn omfattende fortynning med en buffer med lav ledningsevne, eller mer foretrukket med vann, og inkubere G-CSF fra trinn (c),

hvor det andre refoldingstrinnet utføres i en buffer med lav ledningsevne, med en ledningsevne i det minste under 2mS/cm og i mer enn 12 timer.

- 15 2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor inklusjonslegemene er fra en mikroorganisme, fortrinnsvis fra *E. coli*.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, hvor G-CSF er rekombinant bovin eller human metionyl-G-CSF.

- 20 4. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav hvor oppløsningsmiddelet er N-Lauroylsarcosin.

- 25 5. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor oksidasjonsmiddelet er CuSO₄.

6. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor oppløsningen av G-CSF utføres ved en pH-verdi som er høyere enn pH 7.

- 30 7. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor oppløsningsmiddelet er N-Lauroylsarcosin i en konsentrasjon på 0,5% til 1,5%.

8. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor oksidasjonen og det første refoldingstrinnet utføres i minst to timer.

9. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor oksidasjonen og det første refoldingstrinnet utføres under luftstrøm og uten avkjøling.

5 10. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor oksidasjonen og det første refoldingstrinnet utføres ved en pH-verdi på 7-9 og/eller ved en temperatur på 20-28 °C og/eller i 15-25 timer.

10 11. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor fjerningen av oppløsningsmiddelet i trinn (c) omfatter: AEX og CEX, eventuelt i denne rekkefølge.

12. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor fjerningen av oppløsningsmiddelet i trinn (c) omfatter:

15 a) binding til et anionbytterharpiksmateriale ved å blande G-CSF-oppløsningen med det suspenderte harpiksmaterialet og fjerning av harpiksmaterialet ved filtrering og/eller

b) ionbytterkromatografi under betingelser hvor oppløsningsmiddelet binder seg til harpiksen og G-CSF forblir i strømmen gjennom og/eller,

c) ionbytterkromatografi under betingelser hvor G-CSF binder til harpiksen og oppløsningsmiddelet forblir i gjennomstrømningen.

20 13. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor oppløsningsmiddelet og andre urenheter fjernes ved sekvensiell anvendelse av følgende trinn:

- 25 (i) AEX,
(ii) sur utfelling
(iii) AEX, og
(iv) CEX.

30 14. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor oppløsningsmiddelet og andre urenheter fjernes ved sekvensiell anvendelse av følgende trinn:

- a) binding av oppløsningsmiddelet til et anionbytterharpiksmateriale ved å blande G-CSF-oppløsningen med det suspenderte harpiksmaterialet og fjerning av harpiksmaterialet ved filtrering;

b) utfelling av urenheter ved å senke pH til under pH 5 og ved fjerning av utfellingen ved filtrering;

c) anionbytterkromatografi utført under betingelser hvor det gjenværende oppløsningsmiddelet binder til harpiksen og G-CSF forblir i strømmen gjennom;

5 d) kationbytterkromatografi utført under betingelser hvor G-CSF binder til harpiksen og det gjenværende oppløsningsmiddelet forblir i strømmen gjennom; og

10 e) eluering av bundet G-CSF fra kationbytterharpiksen ved trinn- eller gradienteluering ved å anvende en elueringsbuffer med økt pH eller saltkonsentrasjon.

15 15. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor det andre refoldingstrinnet utføres under avkjølte betingelser.

16. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor det andre refoldingstrinnet utføres ved en temperatur på 2-8 °C og/eller i minst 24 timer.

20 17. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor det andre refoldingstrinnet utføres ved en pH-verdi over pH 7.

18. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor fremgangsmåten videre omfatter et poleringstrinn, som omfatter en eller flere ionebyttekromatografier hvor eventuelt den ene eller flere ionbytterkromatografier i poleringstrinnet omfatter en anionbytterkromatografi fulgt av en
25 kationbytterkromatografi.

19. Fremgangsmåte ifølge krav 18, hvor den ene eller flere ionbytterkromatografier omfatter følgende trinn:

30 a) anionbyttekromatografi utført under betingelser hvor G-CSF binder til harpiksen;

b) eluering av bundet G-CSF ved trinn- eller gradienteluering ved bruk av en elueringsbuffer med nedsatt pH eller økt saltkonsentrasjon;

c) kationbytterkromatografi utført under betingelser hvor G-CSF binder til harpiksen;

d) eluering av bundet G-CSF ved trinn- eller gradienteluering ved anvendelse av en elueringsbuffer med økt pH eller saltkonsentrasjon;

karakterisert ved at

5 polymerstammene av anion- og kationbytterharpikser begge omfatter metakrylatderivater.