



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2771364 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2019.10.14
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2019.05.22
(86)	European Application Nr.	12783931.4
(86)	European Filing Date	2012.10.26
(87)	The European Application's Publication Date	2014.09.03
(30)	Priority	2011.10.27, DK, 201100826 2011.10.27, US, 201161552272 P
(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	Genmab A/S, Kalvebod Brygge 43, 1560 Copenhagen V, Danmark
(72)	Inventor	GRAMER, Michael, 484 Linden Lane, Lino Lakes, MA 55014, USA KUNDU, Amitava, 6275 Ranier Lane North, Maple Grove, MA 55311, USA VAN DEN BREMER, Ewald T.J., Genmab B.V.Yalelaan 60, CM 3584 Utrecht, Nederland VAN KAMPEN, Muriel, Genmab B.V.Yalelaan 60, CM 3584 Utrecht, Nederland PRIEM, Patrick, Genmab B.V.Yalelaan 60, CM 3584 Utrecht, Nederland LABRIJN, Aran Frank, Genmab B.V.Yalelaan 60, CM 3584 Utrecht, Nederland MEESTERS, Joyce, I., Genmab B.V.Yalelaan 60, CM 3584 Utrecht, Nederland NEIJSEN, Joost J., Genmab B.V.Yalelaan 60, CM 3584 Utrecht, Nederland SCHUURMAN, Janine, Genmab B.V.Yalelaan 60, CM 3584 Utrecht, Nederland PARREN, Paul, Genmab B.V.Yalelaan 60, CM 3584 Utrecht, Nederland VAN BERKEL, Patrick, Derde Westerparklaan 321, NH 3544 Utrecht, Nederland VOS, Werner L., Genmab B.V.Yalelaan 60, CM 3584 Utrecht, Nederland GERRITSEN, Arnout, Genmab B.V.Yalelaan 60, CM 3584 Utrecht, Nederland
(74)	Agent or Attorney	ONSAGERS AS, Postboks 1813, Vika, 0123 OSLO, Norge

(54) Title **PRODUCTION OF HETERODIMERIC PROTEINS**

(56) References
Cited: WO-A1-2007/147901
 WO-A1-2008/119353

WO-A2-98/50431

WO-A2-2011/133886

WO-A2-2011/131746

WO-A2-2010/063785

STUBENRAUCH KAY ET AL: "Impact of Molecular Processing in the Hinge Region of Therapeutic IgG4 Antibodies on Disposition Profiles in Cynomolgus Monkeys", DRUG METABOLISM AND DISPOSITION, WILLIAMS AND WILKINS, BALTIMORE, MD, US, vol. 38, no. 1, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 84-91, XP009138436, ISSN: 0090-9556, DOI: 10.1124/DMD.109.029751 [retrieved on 2009-10-22]

JENNIFER CARLRING ET AL: "A Novel Redox Method for Rapid Production of Functional Bi-Specific Antibodies For Use in Early Pilot Studies", PLOS ONE, vol. 6, no. 7, 1 January 2011 (2011-01-01) , pages e22533-e22533, XP055049782, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0022533

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 *in vitro*-fremgangsmåte for produksjon av et bispesifikt fullengde-antistoff som omfatter de følgende trinnene:

- 5 a) inkubere et første fullengde-antistoff med et andre full lengde-antistoff under reduserende betingelser som er tilstrekkelige for å tillate reduksjon av inter-kjede-disulfidbindingene i hengsleregionen, og der CH3-regionen til nevnte første fullengde-antistoff er en første CH3-region og har en Arg på posisjon 409, og CH3-regionen i nevnte andre fullengde-antistoff er en andre
- 10 CH3-region og har:
 - i) en Asp, Glu, Gly, Asn, Arg, Ser, Thr, Val eller Trp på posisjon 368;
 - ii) en Phe, His, Lys, Arg eller Tyr på posisjon 399;
 - iii) en Gly, Leu, Met eller Trp på posisjon 407 og en Lys på posisjon 409, og der den første CH3 videre har en Tyr på posisjon 407; eller
 - 15 iv) en aminosyre forskjellig fra Phe, Arg eller Gly på posisjon 405 og har en Lys på posisjon 409, og der den første CH3 videre har en Phe på posisjon 405,
- slik at sekvensene til nevnte første og andre CH3-regioner er forskjellige og er slik at den heterodimere interaksjonen mellom nevnte første og andre
- 20 CH3-regioner er sterkere enn hver av de homodimere interaksjonene til nevnte første og andre CH3-regioner, der aminosyreposisjonene er nummerert i overensstemmelse med EU-indeksen som beskrevet i Kabat, der nevnte første og andre fullengde-antistoff binder ulike epitoper, der nevnte første og andre fullengde-antistoff:
- 25
 - 1) hver har en Fc-region med en aminosyresekvens som er av en IgG1-isotype;
 - 2) hver har en Fc-region med en aminosyresekvens som er av en IgG2-isotype;
 - 3) hver har en Fc-region med en aminosyresekvens som er av en IgG3-
 - 30 isotype; eller
 - 4) hver har en Fc-region med en aminosyresekvens som er av en IgG4-isotype; og

- der nevnte første og andre antistoff er humaniserte antistoff eller der nevnte første og andre antistoff hver omfatter en fullengde-tungkjede av et humant antistoff; og videre der trinn a) omfatter inkubering i minst 90 minutter ved en temperatur på
- 5 minst 20 °C i nærværet av 2-merkaptetoetylamin ved en konsentrasjon på minst 25 mM;
- b) utsette minst 10 ml av sammensetningen som er oppnådd i trinn a) overfor oksiderende betingelser som er tilstrekkelige til å tillate oksidering av cysteiner i det bispesifikke fullengde-antistoffet til inter-kjede-disulfidbindinger, og
- 10 c) oppnå det bispesifikke fullengde-antistoffet.

2. *In vitro*-fremgangsmåte ifølge krav 1,
- der både første og andre fullengde-antistoff omfatter en Cys-Pro-Pro-Cys-sekvens i hengselregionen.

15

3. *In vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
- der trinn a) omfatter tilsetning av et metall-chelaterende middel slik som EDTA, EGTA eller sitronsyre.

- 20 4. *In vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
- der trinn a) blir utført under reduserende betingelser med et redoks-potensiale mellom -150 og -600 mV, slik som mellom -350 og -450 mV.

5. *In vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
- 25 der det første og det andre full lengde-antistoffet er i en buffer, som omfatter i området av 1 - 100 mM fosfat, slik som 1 - 50 mM fosfat eller i området av 1 - 25 mM, eller i området av 5 - 20 mM.

6. *In vitro*-fremgangsmåte ifølge krav 5,
- 30 der bufferen har pH i området av 4,5 - 8,5, slik som i området av 6,5 til 7,5.

7. *In vitro*-fremgangsmåte ifølge krav 5,
der bufferen er valgt fra gruppen som består av a) 8,1 mM natriumfosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 1,5 mM kaliumfosfat (KH_2PO_4), 138 mM natriumklorid (NaCl), 2,7 mM kaliumklorid (KCl) pH 5,0; b) 8,1 mM natriumfosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 1,5 mM kaliumfosfat (KH_2PO_4), 138 mM natriumklorid (NaCl), 2,7 mM kaliumklorid (KCl) pH 7,0; 3) 20 mM Tris-HCl, pH 7,8.
8. *In vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
der trinn b) omfatter en pH i området 6 - 8,5.
9. *In vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
der trinn b) omfatter et redoks-potensiale på minst -300 mV.
10. *In vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
der de oksiderende betingelsene i trinn b) omfatter tilstedeværelsen av minst 0,05 mM oksygen.
11. *In vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
der de oksiderende betingelsene i trinn b) omfatter tilsetning av oksygen, der tilsetningen av oksygen blir utført ved fremgangsmåtene som omfatter: mekanisk, f.eks. ved agitasjon, røring, økt trykk eller dannelsen av strømning, eller ved oversprøyting med oksygen eller luft.
12. *In vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
der de oksiderende betingelsene i trinn b) omfatter et oksidasjonsmiddel, slik som f.eks. dehydroaskorbinsyre (dhAA).
13. *In vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,

der trinn b) omfatter å utsette sammensetningen som er oppnådd i trinn a) for kromatografi, slik som f.eks. kolonnekromatografi eller for filtrering, fortrinnsvis diafiltrering slik som tangentiell strømningsfiltrering (TFF) eller normal
5 strømningsfiltrering (NFF).

14. *In vitro*-fremgangsmåte ifølge krav 13,
der diafiltreringen blir utført ved å sirkulere sammensetningen gjennom en hul
fiberpatron som omfatter en cut-off verdi i området 10 - 50 kDA, og med et
10 overflateareal i området 0,05 - 1 m², og med et patroninntakstrykk i området 70 -
280 kPa, inntil én til syv volumer av bufferutbytting har funnet sted.

15. *In vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
der konsentrasjonen av det bispesifikke fullengde-antistoffet i sammensetningen
15 oppnådd i trinn a) er i området 1 - 100 g/L.

16. *In vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
der de oksiderende betingelsene i trinn b) omfatter tilsetning av et metallion,
fortrinnsvis et metallion som er valgt fra gruppen som består av: kobber, mangan,
20 magnesium, jern, nikkel og kobolt, der metallionkonsentrasjonen fortrinnsvis er i
området fra 0,1 til 100 µM.

17. *In vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
der forholdet mellom det første og det andre fullengde-antistoffet i trinn a) er i
25 området 1:1,01 til 1:2.

18. *In vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
der enten det første eller det andre fullengde-antistoffet ikke er i stand til å binde til
Protein-A og/eller Protein-G.

19. *In vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
der det første og det andre fullengde-antistoffet omfatter ulike lettkjeder.
- 5 20. *In vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
der den totale konsentrasjonen av det første fullengde-antistoffet og det andre
fullengde-antistoffet i trinn a) er minst 0,25 mg/ml.
21. *In vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
10 der nevnte første fullengde-antistoff omfatter en Phe på posisjon 405 og en Arg på
posisjon 409 og nevnte andre fullengde-antistoff omfatter en Leu på posisjon 405 og
en Lys på posisjon 409.