



(12) Translation of  
European patent specification

(11) NO/EP 2791176 B1

NORWAY

(19) NO

(51) Int Cl.

C07K 16/28 (2006.01) C07K 1/20 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01) C07K 1/34 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

---

|      |                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|------|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (21) | Translation Published                                                      | 2018.11.26                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| (80) | Date of The European<br>Patent Office Publication of<br>the Granted Patent | 2018.07.11                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| (86) | European Application Nr.                                                   | 12857495.1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| (86) | European Filing Date                                                       | 2012.12.14                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| (87) | The European Application's<br>Publication Date                             | 2014.10.22                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| (30) | Priority                                                                   | 2011.12.15, KR, 20110135652                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| (84) | Designated Contracting<br>States:                                          | AL ; AT ; BE ; BG ; CH ; CY ; CZ ; DE ; DK ; EE ; ES ; FI ; FR ; GB ; GR ; HR ; HU ;<br>IE ; IS ; IT ; LI ; LT ; LU ; LV ; MC ; MK ; MT ; NL ; NO ; PL ; PT ; RO ; RS ; SE ; SI ;<br>SK ; SM ; TR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| (73) | Proprietor                                                                 | PRESTIGE BIOPHARMA PTE. LTD., 15 Tech Park Crescent, Singapore 638117,<br>Singapore                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| (72) | Inventor                                                                   | YOON, Ji Yong, 502-301 Daedeok Techno Valley 5-danji Apt. Gwanpyeong-dong<br>Yuseong-gu, Daejeon 305-509, Sør-Korea<br>LEE, Dong Eun, 106-1004 Unam Neomia Apt. Deongmyeong-dong Yuseong-gu,<br>Daejeon 305-320, Sør-Korea<br>KIM, Won Kyum, 204-505 Songnimmaeul 2-danji Hagi-dong Yuseong-gu, Daejeon<br>305-759, Sør-Korea<br>YOUN, Jeong Won, 103-701 Xi Apt. Jungnim-ri Jochiwon-eup, Sejong 339-763,<br>Sør-Korea<br>BAEK, Jung Eun, 613-402 Unam Neomia Gwanpyeong-dong Yuseong-gu, Daejeon<br>305-746, Sør-Korea |
| (74) | Agent or Attorney                                                          | Novagraaf Brevets, Bâtiment O2, 2, rue Sarah Bernhardt CS90017, 92665<br>ASNIÈRES-SUR-SEINE CEDEX, Frankrike                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |

---

(54) Title                    **A METHOD OF ANTIBODY PURIFICATION**

(56) References  
Cited:                    WO-A1-2011/098526, WO-A2-2007/117490, STEIN, A. ET AL.: 'Cation exchange  
chromatography in antibody purification: pH screening for optimised binding and HCP removal.'  
JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B. vol. 848, 17 November 2006, pages 151 - 158,  
XP005922836, KR-A- 20090 005 315, WO-A2-2008/087184, WO-A1-2011/009623, GAGNON,  
PETE.: 'Use of Hydrophobic Interaction Chromatography With a Non-Salt Buffer System for  
Improving Process Economics in Purification of Monoclonal Antibodies.' TOSOH BIOSCIENCE.  
ORIGINALLY PRESENTED AT WATERSIDE CONFERENCE ON MONOCLONAL

ANDRECOMBINANT ANTIBODIES. 30 April 2000, XP055150709, KR-A- 20070 001 968, STEIN ET AL: "Cation exchange chromatography in antibody purification: pH screening for optimised binding and HCP removal", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B: BIOMEDICAL SCIENCES & APPLICATIONS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 848, no. 1, 12 March 2007 (2007-03-12), pages 151-158, XP005922836, ISSN: 1570-0232, DOI: 10.1016/J.JCHROMB.2006.10.010

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 preparere en populasjon av antistoffer hvori mer  
5 en 65 % av populasjonen er aktive antistoffer, omfattende:

(a) laste en prøve omfattende en blanding av antistoffer inn i en  
preekvilbert kation utvekslingskolonne, deretter eventuelt vaske  
kolonnen med en vaskebuffer og eluere antistoffer som er bundet til  
10 kolonnen med elueringsbuffer, dermed fjerne vertscelleproteiner  
(HCP-er) og antistoffisoformer fra prøven,

hvori prøven i trinn (a) har en konduktivitet på 5 til 7 mS/cm;

(b) laste inne en prøve preparert ved å blande salt med eluatet i  
15 trinn (a) med en HIC (hydrophobic interaction column) og eluere  
antistoffene som bindes til kolonnen, med en elueringsbuffer,  
dermed fjerne vertscelleproteinene (HCP-er) fra elueringen i trinn (a);  
og

(c) laste elueringen i trinn (b) inn i en anionutvekslingskolonne og  
20 samle gjennomstrømningen.

2. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori prøven i trinn (a) prepareres ved å  
justere pH-verdien til en kultursupernatant slik at den er i et område fra  
25 pH 4 til 6 for å kunne fjerne bunnfall.

3. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori  
antistoffer har et isoelektrisk punkt på 8 til 10; eller  
antistoffet er Trastuzumab.

4. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori eluatet i trinn (a) omfatter 65 til 80 % aktive antistoffer, 15 til 30 % syreholdige antistoffisoformer og 5 til 20 % alkaliske antistoffisoformer.
- 5 5. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori antistoffisoformen i trinn (a) er en syreholdig antistoffisoform.
6. Fremgangsmåten ifølge krav 5, hvori kation utvekslingskolonnen i trinn (a) er en karboksymetyl (CM) sefarose-kolonne.
- 10 7. Fremgangsmåten ifølge krav 6, hvori trinn (a) omfatter:
- (i) laste prøven inn til karboksymetyl (CM) sefarose-kolonnen som er preekvilibrert med en ekvibreringsbuffer omfattende 20 til 30 mM natriumacetat (pH 4,5 til 5,5) og 35 til 45 mM natriumklorid (NaCl);
- 15 (ii) vaske kolonnen med en buffer omfattende 20 til 30 mM natriumacetat (pH 4,5 til 5,5) og 35 til 45 mM natriumklorid;
- (iii) vaske kolonnen med en buffer omfattende 20 til 30 mM Tris-hydrogenklorid (Tris-HCl) (pH 7,0 til 7,5);
- 20 (iv) vaske kolonnen med en buffer omfattende 20 til 30 mM Tris-hydrogenklorid (pH 7,0 til 7,5) og 20 til 30 mM natriumklorid;
- (v) vaske kolonnen med en buffer omfattende 20 til 30 mM Tris-hydrogenklorid (pH 7,0 til 7,5); og
- 25 (vi) eluere antistoffer fra kolonnen med en elueringsbuffer omfattende 20 til 30 mM Tris-hydrogenklorid (pH 7,0 til 7,5) og 80 til 100 mM natriumklorid.
8. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori antistoffisoformen i trinn (a) er en syreholdig antistoffisoform og en alkalisk antistoffisoform.
- 30 9. Fremgangsmåten ifølge krav 8, hvori kation utvekslingskolonnen i trinn (a) er en Fractogel COO-kolonne.

**10.** Fremgangsmåten ifølge krav 9, hvori trinn (a) omfatter:

- 5 (i) laste prøven inn i Fractogel COO-kolonnen preekvilbert med en  
ekvilibreringsbuffer omfattende 20 til 30 mM natriumacetat (pH 4,5  
til 5,5) og 35 til 45 mM natriumklorid (NaCl);
- (ii) vaske kolonnen med en buffer omfattende 20 til 30 mM  
natrimacetat (pH 4,5 til 5,5) og 35 til 45 mM natriumklorid;
- 10 (iii) vaske kolonnen med en buffer omfattende 25 til 35 mM  
natriumacetat (pH 5,5 til 6,5);
- (iv) vaske kolonnen med en buffer omfattende 25 til 35 mM  
natrimacetat (pH 5,5 til 6,5) og 45 til 55 mM natriumklorid;
- (v) vaske kolonnen med en buffer omfattende 25 til 35 mM  
natriumacetat (pH 5,5 til 6,5); og
- 15 (vi) eluere antistoffer fra kolonnen med en elueringsbuffer  
omfattende 25 til 35 mM natriumacetat og 70 til 90 mM  
natriumklorid.

- 11.** Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori antistoffene som bindes til  
20 kolonnen i trinn (b), elueres med en lineær gradient i saltkomponent til  
elueringsbufferen.

**12.** Fremgangsmåten ifølge krav 11, hvori trinn (b) omfatter

- 25 (i) laste inn en prøve preparert ved å justere sitratkonsentrasjonen  
til elueringen i trinn (a) slik at den er lik en ekvilibreringsbuffer  
omfattende 25 til 35 mM acetat (pH 5,5 til 6,5) og 0,3 til 1,0 M  
natriumsitrat, til HIC (hydrophobic interaction column) som  
preekvilberes med ekvilibreringsbufferen;
- 30 (ii) eluere antistoffene fra kolonnen med en elueringsbuffer  
omfattende 25 til 35 mM acetat (pH 5,5 til 6,5) i en lineær gradient.

**13.** Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori

(a) HIC i trinn (b) er en fenylsefarošekolonne; eller

(b) anionutveklingskolonnen i trinn (c) er en Q Fast Flow-kolonne.

5

**14.** Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori anionutvekslingskolonnen  
ekvilibreres med en ekvilibreringsbuffer i området fra pH 7,0 til 8,0 for  
innlasting.

10 **15.** Fremgangsmåten ifølge krav 14, hvori ekvilibreringsbufferen omfatter  
Tris-HCl (pH 7,0 til 8,0).