



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3728288 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 1/22 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2022.03.28
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2022.01.19
(86)	European Application Nr.	18842505.2
(86)	European Filing Date	2018.12.20
(87)	The European Application's Publication Date	2020.10.28
(30)	Priority	2017.12.21, US, 201762609214 P 2018.07.05, US, 201862694387 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	Genzyme Corporation, 50 Binney Street, Cambridge, MA 02142, USA
(72)	Inventor	BEIGIE, Carl A., c/o Sanofi 55Corporate Drive Mail Code: 55A-525, Bridgewater, New Jersey 08807, USA
(74)	Agent or Attorney	RWS, Europa House, Chiltern Park, Chiltern Hill, SL99FG CHALFONT ST PETER, Storbritannia

(54)	Title	METHODS FOR ENHANCED REMOVAL OF IMPURITIES DURING PROTEIN A CHROMATOGRAPHY
(56)	References Cited:	WO-A1-2011/073389 WO-A2-2007/081906

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. Framgangsmåte for å rense et polypeptid som omfatter en Fc-region, der framgangsmåten omfatter trinnene:
 - 5 (a) å sette en protein A-kromatografimatriks i kontakt med en prøve som omfatter (i) polypeptidet som omfatter Fc-regionen, og (ii) én eller flere urenheter, under et vilkår om at polypeptidet som omfatter Fc-regionen, binder seg til protein A; og
 - (b) å vaske matriksen med en vaskeløsning, der vaskeløsningen omfatter én eller begge av (i) et benzoatsalt i en konsentrasjon på fra ca. 0,1 M til ca. 1,0 M og (ii) benzylalkohol
 - 10 at i en konsentrasjon på fra ca. 0,5 % til ca. 4 % volum/volum (v/v), og der vaskeløsningen har en pH på fra ca. 4,0 til ca. 10,0.
2. Framgangsmåte ifølge krav 1, der vaskeløsningen omfatter: 1) benzoatsalt; 2) benzylalkohol; eller 3) benzoatsalt og benzylalkohol, eventuelt der
 - 15 (i) benzoatsaltet er i en konsentrasjon på fra ca. 0,1 M til ca. 0,5 M; og/eller
 - (ii) benzoatsaltet er et benzoatalkalisalt; og/eller
 - (iii) benzoatsaltet er natriumbenzoat, eventuelt der natriumbenzoatet er i en konsentrasjon på fra ca. 0,1 M til ca. 0,3 M, eller i en konsentrasjon på ca. 0,3 M, eller ca. 0,5 M; og/eller
 - 20 (iv) benzylalkoholen er i en konsentrasjon på fra ca. 1 % til ca. 4 % (v/v), eller i en konsentrasjon på fra ca. 1 % til ca. 2 % (v/v), eller i en konsentrasjon på fra ca. 2 % (v/v) til ca. 4 % (v/v).
3. Framgangsmåte ifølge krav 1 eller krav 2, der vaskeløsningen
 - 25 (i) ytterligere omfatter et bufringsmiddel, eventuelt der bufringsmiddelet er valgt fra gruppen som består av fosfat, tris, arginin, acetat og sitrat; og/eller der bufringsmiddelet er i en konsentrasjon på fra ca. 10 mM til ca. 500 mM, eller i en konsentrasjon på ca. 50 mM eller 500 mM; og/eller
 - (ii) har en pH på (a) fra ca. 5,0 til ca. 10,0, eller (b) fra ca. 5,0 til ca. 9,0, eller (c) ca. 5,0,
 - 30 ca. 6,0, ca. 7,0, ca. 9,0 eller ca. 10,0; og/eller
 - (iii) ytterligere omfatter:
 - (a) natriumbenzensulfonat, eventuelt der natriumbenzensulfonatet er i en konsentrasjon på fra ca. 0,1 M til ca. 0,5 M; og/eller
 - (b) kaprylsyre, eventuelt der kaprylsyren er i en konsentrasjon på fra ca. 10 mM til ca.
 - 35 50 mM; og/eller
 - (c) heksylenglykol, eventuelt der heksylenglykolen er i en konsentrasjon på fra ca. 1 % til ca. 10 % (v/v); og/eller

(d) kreatin, eventuelt der kreatinet er i en konsentrasjon på fra ca. 10 mM til ca. 100 mM; og/eller

(e) arginin, eventuelt der argininet er i en konsentrasjon på fra ca. 0,1 M til ca. 1,0 M eller der argininet er i en konsentrasjon på ca. 0,5 M, og/eller der argininet er arginin-HCl, og/eller der vaskeløsningen som omfatter arginin har en pH på fra ca. 4,0 til ca. 6,0 eller en pH på fra ca. 8,0 til ca. 10,0;

(iv) ytterligere omfatter ett eller flere ikke-bufrende salter, eventuelt der det ene eller de flere ikke-bufrende saltene er i en konsentrasjon på fra ca. 0,1 M til ca. 1,0 M, og/eller der det ene eller de flere ikke-bufrende saltene er valgt fra gruppen som består av natriumklorid, natriumbromid, kaliumklorid, kaliumbromid, magnesiumklorid, magnesiumbromid, kalsiumklorid, kalsiumbromid og en hvilken som helst kombinasjon av dette, eller der det ene eller de flere ikke-bufrende saltene er natriumklorid og/eller kaliumklorid.

4. Framgangsmåte ifølge et av kravene 1–3, der vaskeløsningen er en løsning valgt fra gruppen som består av:

(i) en løsning som omfatter natriumbenzoat i en konsentrasjon på ca. 0,5 M, og natriumbikarbonat i en konsentrasjon på ca. 50 mM, som har en pH på ca. 10,0;

(ii) en løsning som omfatter natriumbenzoat i en konsentrasjon på ca. 0,5 M, benzylalkohol i en konsentrasjon på ca. 2 %, arginin i en konsentrasjon på ca. 0,5 M, og natriumfosfat i en konsentrasjon på ca. 50 mM, som har en pH på ca. 9,0;

(iii) en løsning som omfatter natriumbenzoat i en konsentrasjon på ca. 0,5 M og benzylalkohol i en konsentrasjon på ca. 2 % (v/v), som har en pH på ca. 7,0;

(iv) en løsning som omfatter natriumbenzoat i en konsentrasjon på ca. 0,5 M, benzylalkohol i en konsentrasjon på ca. 2 % (v/v), og natriumklorid i en konsentrasjon på ca. 0,5 M, som har en pH på ca. 7,0;

(v) en løsning som omfatter heksylenglykol i en konsentrasjon på ca. 10 % (v/v), natriumbenzoat i en konsentrasjon på ca. 0,5 M, og benzylalkohol i en konsentrasjon på ca. 2 % (v/v), som har en pH på ca. 7,0;

(vi) en løsning som omfatter benzensulfonat i en konsentrasjon på ca. 0,5 M, natriumbenzoat i en konsentrasjon på ca. 0,5 M, og benzylalkohol i en konsentrasjon på ca. 2 % (v/v), som har en pH på ca. 7,0;

(vii) en løsning som omfatter kaprylsyre i en konsentrasjon på ca. 50 mM, natriumbenzoat i en konsentrasjon på ca. 0,5 M, arginin i en konsentrasjon på ca. 0,5 M, og natriumklorid i en konsentrasjon på ca. 0,5 M, som har en pH på ca. 7,0;

(viii) en løsning som omfatter natriumbenzoat i en konsentrasjon på ca. 0,5 M, benzylalkohol i en konsentrasjon på ca. 2 % (v/v), og arginin i en konsentrasjon på ca. 0,5 M, som har en pH på ca. 6,0;

(ix) en løsning som omfatter natriumbenzoat i en konsentrasjon på ca. 0,5 M, benzylalkohol i en konsentrasjon på ca. 2 % (v/v), og arginin i en konsentrasjon på ca. 0,5 M, som har en pH på ca. 5,0; og

5 (x) en løsning som omfatter benzylalkohol i en konsentrasjon på ca. 2 % (v/v) og arginin i en konsentrasjon på ca. 0,5 M, som har en pH på ca. 5,0.

5. Framgangsmåte ifølge et av kravene 1–4, som ytterligere omfatter:

10 (i) et trinn med å vaske matriksen med en første løsning før matriksen blir vasket med vaskeløsningen i trinn (b) i krav 1, eventuelt der den første løsningen omfatter en buffer valgt fra gruppen som består av en fosfatbuffer, en trisbuffer, en acetatbuffer, en karbonatbuffer, en sitratbuffer, og en hvilken som helst kombinasjon av dette, eventuelt der den første løsningen omfatter bufferen i en konsentrasjon på fra ca. 10 mM til ca. 100 mM, og/eller eventuelt der den første løsningen er en fosfatbuffer; og/eller

15 (ii) et trinn med å vaske matriksen med en andre løsning etter at matriksen er vasket med vaskeløsningen i trinn (b) i krav 1, eventuelt der den andre løsningen omfatter en buffer valgt fra gruppen som består av en fosfatbuffer, en trisbuffer, en acetatbuffer, en karbonatbuffer, en sitratbuffer, og en hvilken som helst kombinasjon av dette, eventuelt der den andre løsningen omfatter bufferen i en konsentrasjon på fra ca. 10 mM til ca. 100 mM, og/eller eventuelt der den andre løsningen har en pH på fra ca. 5,0 til ca. 7,0, 20 og/eller eventuelt der den andre løsningen omfatter vesentlig lavt salt eller ikke noe salt; og/eller

(iii) et trinn med å sette protein A-kromatografimatriksen i kontakt med en elueringsløsning etter ett eller flere vasketrinn, og eventuelt som ytterligere omfatter trinnet med å samle opp et eluat som omfatter polypeptidet som omfatter Fc-regionen, 25 eventuelt som ytterligere omfatter et trinn med å filtrere eluatet via dybdefiltrering, og/eller der eluatet omfatter mindre enn ca. 500 deler per million (ppm) av den ene eller de flere urenheterne.

6. Framgangsmåte ifølge et av kravene 1–5, der

30 (i) framgangsmåten fører til at polypeptidet som omfatter Fc-regionen, blir rensset bort fra den ene eller de flere urenheterne i en høyere grad enn en korresponderende framgangsmåte som mangler trinnet med å vaske matriksen med vaskeløsningen; og/eller

(ii) der den ene eller de flere urenheterne er vertcelleproteiner (HCP-er), eventuelt der det ene eller de flere HCP-ene er valgt fra gruppen som består av fosfolipaser, clusterin, 35 serinproteaser, forlengelsesfaktorer, og en hvilken som helst kombinasjon av dette, og/eller der HCP-et er putativ fosfolipase B-liknende 2 (PLBL2), og/eller der vertcellen er en vertcelle fra et pattedyr, og/eller der vertcellen er en eggstokkcelle fra kinesisk dverghamster (CHO).

7. Framgangsmåte ifølge et av kravene 1–6, der

(i) Fc-regionen er en Fc-region hos et menneske eller en Fc-region hos en mus, eventuelt der Fc-regionen hos et menneske omfatter en IgG1, IgG2 eller IgG4 Fc-region hos et menneske eller der Fc-regionen hos en mus omfatter en IgG1, IgG2 eller IgG3 Fc-region hos en mus; og/eller

(ii) polypeptidet som omfatter Fc-regionen, er et antistoff, eventuelt der antistoffet er et humant antistoff, et humanisert antistoff, eller et kimært antistoff, og/eller der antistoffet er et monoklonalt antistoff eller et bispesifikt antistoff eller et trispesifikt antistoff.

10

8. Framgangsmåte ifølge et av kravene 1–7, som ytterligere omfatter, før trinn (a), å justere en innhøsting som omfatter polypeptidet som omfatter Fc-regionen for å oppnå en endelig konsentrasjon av et benzoatsalt på mellom ca. 0,1 M og ca. 0,5 M og en pH mellom ca. 7,0 og ca. 9,0 for å framstille prøven som omfatter (i) polypeptidet som omfatter Fc-regionen, og (ii) én eller flere urenheter.

15

9. Framgangsmåte for å rense et polypeptid som omfatter en Fc-region, der framgangsmåten omfatter trinnene:

(A) å justere en innhøsting som omfatter polypeptidet som omfatter Fc-regionen for å oppnå en endelig konsentrasjon av et benzoatsalt på ca. 0,1 M og ca. 0,5 M og en pH mellom ca. 7,0 og ca. 9,0 for å framstille en prøve som omfatter (i) polypeptidet som omfatter Fc-regionen, og (ii) én eller flere urenheter; og

(B) å sette prøven i kontakt med minst én kromatografimatriks.

20

10. Framgangsmåte ifølge krav 8 eller 9, der

(i) benzoatsaltet er et benzoatalkalisalt, eventuelt der benzoatsaltet er natriumbenzoat; og/eller

(ii) den endelige konsentrasjonen av benzoatsaltet i innhøstingen er mellom ca. 0,4 M og ca. 0,5 M; og/eller

(iii) pH-en i innhøstingen er mellom ca. 7,0 og ca. 8,0 eller mellom ca. 8,0 og ca. 9,0; og/eller

(iv) innhøstingen blir generert fra en kultur som omfatter en vertcelle som er modifisert til å uttrykke polypeptidet, eventuelt der vertcellen er en eukaryot vertcelle, eventuelt der den eukaryote vertcellen er en eggstokkcelle fra kinesisk dverghamster (CHO); og/eller

(v) innhøstingen blir klarfiltrert før justeringen og/eller innhøstingen blir klarfiltrert etter justeringen.

25

30

35

11. Framgangsmåte ifølge krav 9 eller krav 10, der den minst ene kromatografimatriksen omfatter en affinitetskromatografimatriks, eventuelt der affinitetskromatografimatriksen er en protein A-kromatografimatriks eller en protein G-kromatografimatriks.

5

12. Framgangsmåte ifølge et av kravene 8–11, som ytterligere omfatter et trinn med (i) å sette den minst ene kromatografimatriksen i kontakt med minst én vaskeløsning; og/eller

10

(ii) å sette den minst ene kromatografimatriksen i kontakt med en elueringsløsning, eventuelt som ytterligere omfatter trinnet å samle opp et eluat som omfatter polypeptidet som omfatter Fc-regionen, eventuelt som ytterligere omfatter et trinn med å filtrere eluatet via dybdefiltrering, og/eller der eluatet omfatter mindre enn ca. 500 deler per million (ppm) av den ene eller de flere urenheterne.

15

13. Framgangsmåte ifølge et av kravene 9–12, der

(i) framgangsmåten fører til at polypeptidet som omfatter Fc-regionen, blir rensset bort fra den ene eller de flere urenheterne i en høyere grad enn en korresponderende framgangsmåte som mangler trinnet med å justere innhøstingen som omfatter polypeptidet som omfatter Fc-regionen for å framstille prøven; og/eller

20

(ii) den ene eller de flere urenheterne er vertcelleproteiner (HCP-er), eventuelt der det ene eller de flere HCP-ene er valgt fra gruppen som består av fosfolipaser, clusterin, serinproteaser, forlengelsesfaktorer, og en hvilken som helst kombinasjon av dette, og/eller der HCP-et er putativ fosfolipase B-liknende 2 (PLBL2).

25

14. Framgangsmåte ifølge et av kravene 9–13, der

(i) Fc-regionen er en Fc-region hos et menneske eller en Fc-region hos en mus, eventuelt der Fc-regionen hos et menneske omfatter en IgG1, IgG2 eller IgG4 Fc-region hos et menneske eller der Fc-regionen hos en mus omfatter en IgG1, IgG2 eller IgG3 Fc-region hos en mus; og/eller

30

(ii) polypeptidet som omfatter Fc-regionen, er et antistoff, eventuelt der antistoffet er et humant antistoff, et humanisert antistoff, eller et kimært antistoff, og/eller der antistoffet er et monoklonalt antistoff eller et bispesifikt antistoff eller et trispesifikt antistoff.