



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3761035 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2024.04.15
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2024.02.14
(86)	European Application Nr.	20191942.0
(86)	European Filing Date	2017.08.18
(87)	The European Application's Publication Date	2021.01.06
(30)	Priority	2016.08.18, US, 201662376788 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
(62)	Divided application	EP3500856, 2017.08.18
(73)	Proprietor	Regeneron Pharmaceuticals, Inc., 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591, USA
(72)	Inventor	MARLOW, Michael, 11 Park Place Apt. 409, New Rochelle, New York 10801, USA SENNETT, Michael, 182 Powder House Boulevard, Sommerville, Massachusetts 02144, USA SCHNEIDER, Michael, c/o Regeneron Pharmaceuticals, Inc. 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, New York 10591, USA
(74)	Agent or Attorney	ZACCO NORWAY AS, Postboks 488, 0213 OSLO, Norge

(54) Title **ASSAY FOR DETERMINING POTENTIAL TO SELF-ASSOCIATION OF A PROTEIN USING CONCENTRATION-DEPENDENT SELF-INTERACTION NANOPARTICLE SPECTROSCOPY**

(56) References
Cited:

WO-A1-2016/115475
WO-A1-2009/039502
Wang Yong-Tang ET AL: "The use of a gold nanoparticle-based adjuvant to improve the therapeutic efficacy of hNgR-Fc protein immunization in spinal cord-injured rats", *Biomaterials*, vol. 32, no. 31, 1 November 2011 (2011-11-01), pages 7988-7998, XP055976507, AMSTERDAM, NL ISSN: 0142-9612, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.07.009
SHANTANU V. SULE ET AL: "Solution pH That Minimizes Self-Association of Three Monoclonal Antibodies Is Strongly Dependent on Ionic Strength", *MOLECULAR PHARMACEUTICS*, vol. 9, no. 4, 2 April 2012 (2012-04-02), pages 744-751, XP055160468, ISSN: 1543-8384, DOI: 10.1021/mp200448j
JIEMIN WU ET AL: "Discovery of highly soluble antibodies prior to purification using affinity-capture self-interaction nanoparticle spectroscopy", *PROTEIN ENGINEERING, DESIGN AND SELECTION*, vol. 28, no. 10, 12 September 2015 (2015-09-12), pages 403-414, XP055340754, GB ISSN: 1741-0126, DOI: 10.1093/protein/gzv045
PETER M. TESSIER ET AL: "Self-Interaction Nanoparticle Spectroscopy: A Nanoparticle-Based Protein Interaction Assay", *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*, vol. 130, no. 10, 1 March 2008 (2008-03-01), pages 3106-3112, XP055407816, US ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/ja077624q

Tianyu Zheng ET AL: "Gold Nanoparticle-Enabled Blood Test for Early Stage Cancer Detection and Risk Assessment", Applied Materials & Interfaces, vol. 7, no. 12, 10 March 2015 (2015-03-10) , pages 6819-6827, XP055402743, US ISSN: 1944-8244, DOI: 10.1021/acsami.5b00371

Hilde Jans ET AL: "Dynamic Light Scattering as a Powerful Tool for Gold Nanoparticle Bioconjugation and Biomolecular Binding Studies", Analytical Chemistry, vol. 81, no. 22, 15 November 2009 (2009-11-15), pages 9425-9432, XP055067927, ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/ac901822w

STEVEN B. GENG ET AL: "Facile Preparation of Stable Antibody-Gold Conjugates and Application to Affinity-Capture Self-Interaction Nanoparticle Spectroscopy", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 27, no. 10, 5 August 2016 (2016-08-05), pages 2287-2300, XP055407798, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00207

STEVEN B. GENG ET AL: "Measurements of Monoclonal Antibody Self-Association Are Correlated with Complex Biophysical Properties", MOLECULAR PHARMACEUTICS, vol. 13, no. 5, 2 May 2016 (2016-05-02), pages 1636-1645, XP055407800, US ISSN: 1543-8384, DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00071

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 bestemme potensialet av et protein til selvassosiasjon, idet fremgangsmåten omfatter:

- 5 a. å kombinere et protein, en gullnanopartikkel og et bufret salt for å danne en prøve, hvor det bufrede salt er en buffer og et salt eller et salt som også er en buffer;
- b. å eksitere prøven med lys;
- c. å måle det gjennom prøven transmitterte lys ved atskillige bølgelengder i området fra cirka 450 nm til cirka 750 nm;
- 10 d. å beregne absorbansintensitetsforholdet for prøven, hvor absorbansintensitetsforholdet er absorbansintensiteten ved bølgelengden for spissabsorpsjon (A_{peak}) for prøven dividert med absorbansintensiteten ved 450 nm (A_{450} eller $A_{initial}$), hvor proteinet er stabilt ved høy konsentrasjon når absorbansintensitetsforholdet er over 1,7, og
- 15 hvor fremgangsmåten videre omfatter å gjenta trinn (a) – (d) i det minste én ytterligere gang under anvendelse av en annen ionestyrke.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor:

- 20 (i) proteinet er et reseptor-Fc-fusjonsprotein eller et antigenbindende protein, fortrinnsvis hvor det antigenbindende protein er et antistoff, et antistoffragment eller et reseptor-Fc-fusjonsprotein, mer foretrukket hvor det antigenbindende protein er et humant monoklonalt antistoff;
- (ii) proteinet er ved en lav konsentrasjon når det er til stede i prøven ved en konsentrasjon på cirka 2 $\mu\text{g/mL}$ til cirka 512 $\mu\text{g/mL}$;
- 25 (iii) gullnanopartikkelen har en diameter på cirka 20 nm til cirka 100 nm, mer foretrukket hvor diameteren av gullnanopartikkelen er cirka 20 nm; eller
- (iv) prøven omfatter cirka 5×10^{11} til cirka 8×10^{11} nanopartikler per mL, fortrinnsvis hvor prøven omfatter cirka $6-6,5 \times 10^{11}$ nanopartikler per mL;
- 30 (v) saltet av det bufrede salt er til stede i prøven ved en konsentrasjon på cirka 2 mM til cirka 250 mM, fortrinnsvis hvor saltet er natriumklorid, mer foretrukket hvor saltkonsentrasjonen er cirka 2 mM, cirka 20 mM eller cirka 200 mM.

- 3.** Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, som videre omfatter:
- (i) å gjenta trinn (a) – (d) under anvendelse av en annen konsentrasjon av protein i prøven.
 - 5 (ii) å gjenta trinn (a) – (d) under anvendelse av en annen konsentrasjon av salt i prøven; og/eller
 - (iii) å gjenta trinn (a) – (d) under anvendelse av en annen pH av prøven.
- 4.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, som videre omfatter:
- 10 e. å kombinere proteinet ved en høy konsentrasjon med en eksipiens for å danne et formulert legemiddelstoff.
- 5.** Fremgangsmåte ifølge krav 4, hvor proteinet er ved en høy konsentrasjon når det er ved en konsentrasjon på cirka 50 mg/mL til cirka 500 mg/mL.
- 15
- 6.** Fremgangsmåte ifølge krav 5, hvor eksipiensen velges fra gruppen som består av et tonifiseringsmiddel, en buffer, et tensid, en stabilisator og en kombinasjon derav, fortrinnsvis hvor tonifiseringsmiddelet er et salt, mer foretrukket hvor saltet er NaCl.
- 20
- 7.** Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor proteinet er et reseptor-Fc-fusjonsprotein.
- 8.** Fremgangsmåte ifølge krav 7, hvor reseptor-Fc-fusjonsprotein er aflibercept.
- 9.** Fremgangsmåte for fremstilling av en farmasøytisk formulering med lav viskositet som inneholder et protein, idet fremgangsmåten omfatter:
- a. å bestemme potensialet av proteinet til selvassosiasjon ifølge fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1-8;
 - b. å kombinere en viskositetssenkende eksipiens med proteinet;
 - 30 c. å bestemme potensialet av proteinet til selvassosiasjon ifølge fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1-8 i nærvær av den viskositetssenkende eksipiens; og

d. å formulere proteinet med den viskositetssenkende eksipiens på et nivå som reduserer proteinløsningens viskositet med i det minste 50% enn uten den viskositetssenkende eksipiens.

- 5 **10.** Fremgangsmåte ifølge krav 9, hvor den viskositetssenkende eksipiens er para-aminobenzosyre (PABA).
- 11.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, hvor proteinet er stabilt, slik at det bibeholder 90% eller mer av sin native struktur ved en høy konsentrasjon når absorbansintensitetsforholdet overstiger 1,7.
- 10
- 12.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, hvor proteinet er til stede i prøven ved en konsentrasjon som ligger over en minstekonsentrasjon som er nødvendig for å dekke gullnanopartiklene fullstendig.
- 15
- 13.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, hvor proteinet er ved en høy konsentrasjon når det er til stede i prøven ved en konsentrasjon på cirka 50 mg/mL til cirka 250 mg/mL.