



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO

(10) Identifikator
dokumenta:



HR P20241208 T1

HR P20241208 T1

(12) **PRIJEVOD PATENTNIH ZAHTEJEVA
EUROPSKOG PATENTA**

(51) MKP:

C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)

(46) Datum objave prijevoda patentnih zahtjeva: 22.11.2024.

(21) Broj predmeta: P20241208T

(22) Datum podnošenja: 20.04.2011.

(86) Broj međunarodne prijave: PCT/EP2011056388
Datum podnošenja međunarodne prijave: 20.04.2011.

(96) Broj europske prijave patenta: EP 11716882.3
Datum podnošenja europske prijave patenta: 20.04.2011.

(87) Broj međunarodne objave: WO 2011131746
Datum međunarodne objave: 27.10.2011.

(97) Broj objave europske prijave patenta: EP 2560993 A2
Datum objave europske prijave patenta: 27.02.2013.

(97) Broj objave europskog patenta: EP 2560993 B1
Datum objave europskog patenta: 26.06.2024.

(31) Broj prve prijave: 201000330
326082 P
201001066

(32) Datum podnošenja prve prijave: 20.04.2010.
20.04.2010.
24.11.2010.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: DK
US
DK

(73) Nositelj patenta:

(72) Izumitelji:

Genmab A/S, Carl Jacobsens Vej 30, 2500 Valby, DK
Aran Frank Labrijn, NL-3584 CT Utrecht, NL
Joyce Meesters, NL-3522 EC CT Utrecht, NL
Ewald van den Bremer, NL-3584 CT Utrecht, NL
Joost J. Neijssen, NL-3584 CT Utrecht, NL
Patrick van Berkel, NL-3544 NH Utrecht, NL
Bart De De Goeij, NL-3584 CT Utrecht, NL
Tom Vink, NL-6285 AZ Epen, NL
Jan Van De Winkel, NL-3584 CT Utrecht, NL
Janine Schuurman, NL-111 CH Diemen, NL
Paul Parren, NL-3984 PR Odijk, NL

(74) Zastupnik:

CPZ - CENTAR ZA PATENTE d.o.o., 10000 Zagreb, HR

(54) Naziv izuma:

HETERODIMERNI PROTEINI KOJI SADRŽE FC FRAGMENT PROTUTIJELA I POSTUPCI ZA
NJIHOVU PROIZVODNJU

HR P20241208 T1

PATENTNI ZAHTEJEVI

1. *In vitro* postupak za generiranje bispecifičnog protutijela, **naznačen time, da** navedeni postupak obuhvaća sljedeće korake:

- a) pripravljanje prvog homodimernog monospecifičnog protutijela koje sadrži Fc regiju imunoglobulina, pri čemu spomenuta Fc regija sadrži prvu CH3 regiju, gdje spomenuto prvo monospecifično protutijelo ima Phe na poziciji 405 i Arg na poziciji 409 u skladu s EU numeriranjem, i slijed Cys-Pro-Pro-Cys u zglobnoj regiji jezgre,
- b) pripravljanje drugog homodimernog monospecifičnog protutijela koje sadrži Fc regiju imunoglobulina, pri čemu spomenuta Fc regija sadrži drugu CH3 regiju, gdje spomenuto drugo monospecifično protutijelo ima Leu na poziciji 405 i Lys na poziciji 409 u skladu s EU numeriranjem, i slijed Cys-Pro-Pro-Cys u zglobnoj regiji jezgre,
- c) inkubiranje spomenutog prvog monospecifičnog protutijela zajedno sa spomenutim drugim monospecifičnim protutijelom pod reduciranim uvjetima dovoljnima kako bi se omogućilo da cisteini u slijedovima Cys-Pro-Pro-Cys zglobne regije jezgre, provode izomerizaciju disulfidne veze, i
- d) dobivanje spomenutog bispecifičnog protutijela;

pri čemu su slijedovi od spomenutih prve i druge CH3 regije različiti i takvi su da je heterodimerna interakcija između spomenutih prve i druge CH3 regije jača nego svaka od homodimernih interakcija od spomenutih prve i druge CH3 regije, i pri čemu se spomenuto prvo monospecifično protutijelo veže na prvi epitop a spomenuta druga monospecifična protutijela se vežu na drugi epitop, gdje su navedeni prvi i drugi epitop različiti.

2. *In vitro* postupak prema patentnom zahtjevu 1, **naznačen time, da** je Fc regija od prvog monospecifičnog protutijela od izotipa odabranog iz skupine koju čine IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4, i time, da je Fc regija od drugog monospecifičnog protutijela od izotipa odabranog iz skupine koju čine IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4.
3. *In vitro* postupak prema bilo kojem od prethodnih patentnih zahtjeva, **naznačen time, da** su Fc regije od oba od spomenutog prvog i spomenutog drugog monospecifičnog protutijela od izotipa IgG1.
4. *In vitro* postupak prema bilo kojem od prethodnih patentnih zahtjeva, **naznačen time, da** heterodimerna interakcija u rezultirajućem bispecifičnom protutijelu je
 - a) takva da se ne može dogoditi izmjena Fab-kraka na 0,5 mM glutationa pod uvjetima koji su opisani u Primjeru 13, i/ili
 - b) takva da se ne događa izmjena Fab-kraka *in vivo* kod miša pod uvjetima koji su opisani u Primjeru 14, i/ili
 - c) više od dva puta jača, tako da je više od tri puta jača, primjerice više od pet puta jača od najjače od dvije homodimerne interakcije, primjerice kada se utvrđuje kao što je opisano u Primjeru 30.
5. *In vitro* postupak prema bilo kojem od prethodnih patentnih zahtjeva, **naznačen time, da** su slijedovi od navedene prve i druge CH3 regije takvi da
 - a) konstanta disocijacije od heterodimera rezultirajućeg bispecifičnog protutijela je ispod 0,5 mikromola kada se ispituje kao što je opisano u Primjeru 30, i/ili
 - b) konstante disocijacije od oba homodimera prvog i drugog monospecifičnog protutijela su iznad 0,01 mikromola, kao što je iznad 0,05 mikromola, poželjno između 0,01 i 10 mikromola, tako da su između 0,05 i 10 mikromola, još poželjnije između 0,01 i 5, tako da su primjerice između 0,05 i 5 mikromola, čak još poželjnije između 0,01 i 1 mikromola, tako da su primjerice između 0,05 i 1 mikromola, između 0,01 i 0,5 ili između 0,01 i 0,1 mikromola, kada se ispituju kao što je opisano u Primjeru 21.
6. *In vitro* postupak prema bilo kojem od prethodnih patentnih zahtjeva, **naznačen time, da** spomenuto prvo homodimerno monospecifično protutijelo nema više od jedne aminokiselinske supstitucije u CH3 regiji, i spomenuto drugo homodimerno monospecifično protutijelo nema više od jedne aminokiselinske supstitucije u CH3 regiji u odnosu na divlji tip CH3 regija.
7. *In vitro* postupak prema bilo kojem od prethodnih patentnih zahtjeva, **naznačen time, da** navedene prva i druga CH3 regija, osim za specificirane mutacije, sadrže slijed prikazan u SEQ ID NO: 1.
8. *In vitro* postupak prema bilo kojem od prethodnih patentnih zahtjeva, **naznačen time, da** spomenuto prvo i drugo homodimerno monospecifično protutijelo, osim za bilo koje specificirane mutacije, jesu ljudska ili humanizirana protutijela.
9. *In vitro* postupak prema bilo kojem od prethodnih patentnih zahtjeva, **naznačen time, da** oba spomenuta prvo i drugo homodimerno monospecifično protutijelo nadalje sadrže laki lanac.
10. *In vitro* postupak prema bilo kojem od prethodnih patentnih zahtjeva, **naznačen time, da** spomenuto prvo i/ili spomenuto drugo homodimerno monospecifično protutijelo posjeduje mutaciju koja odstranjuje prihvatno mjesto za Asn-povezanu glikozilaciju.
11. *In vitro* postupak prema bilo kojem od prethodnih patentnih zahtjeva, **naznačen time, da** se spomenuto prvo i drugo homodimerno monospecifično protutijelo, koji su dobiveni u koraku a) i b), pročišćavaju.
12. *In vitro* postupak prema bilo kojem od prethodnih patentnih zahtjeva, **naznačen time, da** se spomenuto prvo i/ili drugo homodimerno monospecifično protutijelo konjugira na lijek, predlijeak, ili toksin, ili sadrži prihvatnu skupinu za iste.
13. *In vitro* postupak prema bilo kojem od prethodnih patentnih zahtjeva, **naznačen time, da** se spomenuti prvi i/ili spomenuti drugi epitop nalazi na tumorskoj stanici;

se spomenuti prvi ili spomenuti drugi epitop nalazi na tumorskoj stanici a preostali epitop se nalazi na efektorskoj stanici;

se spomenuti prvi ili drugi epitop nalazi na T stanici, kao što je primjerice na CD3 koji je eksprimiran na T stanicu;

se prvo protutijelo ili drugo protutijelo veže na različite epitope na istoj tumorskoj stanici; ili

se prvo protutijelo veže na epitop na tumorskoj stanici, i preostalo protutijelo je irelevantno ili je neaktivno protutijelo bez ikakve relevantne aktivnosti *in vivo* vezanja za namjeravanu primjenu.

14. *In vitro* postupak prema bilo kojem od prethodnih patentnih zahtjeva, **naznačen time, da** reducirani uvjeti u koraku c) obuhvaćaju dodavanje redukcijskog sredstva, primjerice redukcijskog sredstva odabranog iz skupine koju čine: 2-merkaptotetilamin, ditiotreitol i tris(2-karboksietil)fosfin ili njihovi kemijski derivati, ditiotritol, glutation, L-cistein i beta-merkaptotetanol.

15. *In vitro* postupak prema bilo kojem od prethodnih patentnih zahtjeva, **naznačen time, da** se korak c) provodi pod reduciranim uvjetima s redoks potencijalom između -150 i -600 mV, kao što je primjerice između -250 i -400 mV.

16. *In vitro* postupak prema bilo kojem od prethodnih patentnih zahtjeva, **naznačen time, da** korak c) obuhvaća inkubaciju za najmanje 90 min na temperaturi od najmanje 20°C u prisutnosti najmanje 25 mM 2-merkaptotetilamina ili u prisutnosti od najmanje 0,5 mM ditiotreitola.

17. *In vitro* postupak prema bilo kojem od prethodnih patentnih zahtjeva, **naznačen time, da** korak d) obuhvaća odstranjivanje redukcijskog sredstva, primjerice putem desalinizacije.

18. Postupak za odabiranje bispecifičnog protutijela koje ima željena svojstva, **naznačen time, da** navedeni postupak obuhvaća sljedeće korake:

a) pripravljanje prvog kompleta homodimernih protutijela koji sadrži protutijela s različitim varijabilnim regijama i sa slijedom Cys-Pro-Pro-Cys u zglobnoj regiji jezgre, pri čemu navedena protutijela iz spomenutog prvog kompleta sadrže istovjetne prve CH3 regije, gdje spomenute CH3 regije imaju Phe na poziciji 405 i Arg na poziciji 409 u skladu s EU numeriranjem,

b) pripravljanje drugog kompleta homodimernih protutijela koji sadrži protutijela s različitim varijabilnim regijama ili s identičnim varijabilnim regijama i sa slijedom Cys-Pro-Pro-Cys u zglobnoj regiji jezgre, pri čemu navedena protutijela iz spomenutog drugog kompleta sadrže istovjetne druge CH3 regije, gdje spomenute CH3 regije imaju Leu na poziciji 405 i Lys na poziciji 409 u skladu s EU numeriranjem,

c) inkubiranje kombinacija protutijela iz spomenutog prvog kompleta i iz spomenutog drugog kompleta pod reduciranim uvjetima koji su dovoljni za omogućavanje cisteinima u zglobnim regijama da poduzimaju izomerizaciju disulfidne veze, čime se generira komplet bispecifičnih protutijela,

d) opcionalno obnavljanje uvjeta za nereduciranje,

e) ispitivanje rezultirajućeg kompleta bispecifičnih protutijela za zadana željena svojstva, i

f) odabiranje bispecifičnog protutijela koje ima željeno svojstvo;

pri čemu su sljedovi od navedenih prvih i drugih CH3 regija različiti i takvi su da je heterodimerna interakcija između navedenih prvih i drugih CH3 regija jača nego što je to svaka od homodimernih interakcija od navedenih prvih i drugih CH3 regija, i pritom spomenuto prvo i drugo homodimerno protutijelo vežu različite epitope.

19. Postupak za proizvodnju bispecifičnog protutijela, **naznačen time, da** navedeni postupak obuhvaća sljedeće korake:

a) pripravljanje prvog konstrukta nukleinske kiseline koji kodira prvi polipeptid koji sadrži prvi teški lanac pune duljine od protutijela koje sadrži prvu CH3 regiju koja ima Phe na poziciji 405 i Arg na poziciji 409 u skladu s EU numeriranjem, i nadalje ima slijed Cys-Pro-Pro-Cys u zglobnoj regiji jezgre,

b) pripravljanje drugog konstrukta nukleinske kiseline koji kodira drugi polipeptid koji sadrži drugi teški lanac pune duljine od protutijela koje sadrži drugu CH3 regiju koja ima Leu na poziciji 405 i Lys na poziciji 409 u skladu s EU numeriranjem, i nadalje ima slijed Cys-Pro-Pro-Cys u zglobnoj regiji jezgre,

c) koekspiriranje navedenih prvog i drugog konstrukta nukleinske kiseline u stanici domaćina, i

d) dobivanje spomenutog bispecifičnog protutijela iz stanične kulture;

pri čemu su sljedovi od navedenih prvih i drugih CH3 regija različiti i takvi su da je heterodimerna interakcija između navedenih prvih i drugih CH3 regija jača nego što je to svaka od homodimernih interakcija od navedenih prvih i drugih CH3 regija, i pri čemu se navedeni prvi teški lanac pune duljine veže na prvi epitop i navedeni drugi teški lanac pune duljine se veže na drugi epitop, gdje su spomenuti prvi i drugi epitop različiti.

20. Postupak prema patentnom zahtjevu 19, **naznačen time, da** nadalje obuhvaća značajke iz bilo kojega od patentnih zahtjeva 2 do 13.

21. Vektor ekspresije, **naznačen time, da** sadrži konstrukte nukleinske kiseline koji su specificirani u bilo kojem od patentnih zahtjeva 19 do 20.

22. Stanica domaćina, **naznačena time, da** sadrži konstrukte nukleinske kiseline koji su specificirani u bilo kojem od patentnih zahtjeva 19 do 20.

23. Bispecifično protutijelo, **naznačeno time, da** se dobiva ili se može dobiti putem postupka prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 1 do 17, 19 ili 20.

24. Bispecifično protutijelo, **naznačeno time, da** sadrži prvi polipeptid koji posjeduje prvi teški lanac pune duljine protutijela koje sadrži prvu Fc regiju koja sadrži prvu CH3 regiju, i drugi polipeptid koji sadrži drugu Fc regiju koja sadrži drugi teški lanac pune duljine protutijela koje sadrži drugu CH3 regiju,

pri čemu spomenuti prvi teški lanac veže prvi epitop i spomenuti drugi teški lanac veže drugi epitop, gdje su spomenuti prvi i drugi epitop različiti, i gdje su sljedovi od navedenih prvih i drugih CH3 regija različiti i oni su takvi da je heterodimerna interakcija između navedenih prvih i drugih CH3 regija jača nego što je to svaka od homodimernih interakcija od navedenih prvih i drugih CH3 regija, i

- a) time, da spomenuta prva CH3 regija ima Phe na poziciji 405 i Arg na poziciji 409 u skladu s EU numeriranjem, i slijed Cys-Pro-Pro-Cys u zglobnoj regiji jezgre, i
 - b) time, da spomenuta druga CH3 regija ima Leu na poziciji 405 i Lys na poziciji 409 u skladu s EU numeriranjem, i slijed Cys-Pro-Pro-Cys u zglobnoj regiji jezgre.
25. Bispecifično protutijelo prema patentnom zahtjevu 23 ili zahtjevu 24, **naznačeno time, da** je prva Fc regija od izotipa odabranog iz skupine koju čine IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4, i time, da je druga Fc regija od izotipa odabranog iz skupine koju čine IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4.
26. Bispecifično protutijelo prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 23 do 25, **naznačeno time, da** su obje spomenute prva i druga Fc regija od izotipa IgG1.
27. Bispecifično protutijelo prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 23 do 26, **naznačeno time, da** navedena prva CH3 regija nema više od jedne aminokiselinske supstitucije, i navedena druga CH3 regija nema više od jedne aminokiselinske supstitucije u odnosu na divlji tip CH3 regija.
28. Bispecifično protutijelo prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 23 do 27, **naznačeno time, da** navedene prva i druga CH3 regija, osim za specificirane mutacije, sadrže slijed prikazan u SEQ ID NO: 1.
29. Bispecifično protutijelo prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 23 do 28, **naznačeno time, da** su spomenuti prvi i drugi teški lanac pune duljine, osim za bilo koje specificirane mutacije, od ljudskog ili humaniziranog protutijela.
30. Bispecifično protutijelo prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 23 do 29, **naznačeno time, da** nadalje uključuje dva laka lanca pune duljine.
31. Bispecifično protutijelo prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 23 do 30, **naznačeno time, da** spomenuti prvi i/ili spomenuti drugi polipeptid sadrži mutaciju koja odstranjuje prihvatno mjesto za Asn-povezanu glikozilaciju.
32. Bispecifično protutijelo prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 23 do 31, **naznačeno time, da** je spomenuti prvi i/ili spomenuti drugi polipeptid konjugiran na lijek, predlijevak ili toksin, ili posjeduje prihvatnu skupinu za iste.
33. Bispecifično protutijelo prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 23 do 32, **naznačeno time, da**
se spomenuti prvi i/ili spomenuti drugi epitop nalazi na tumorskoj stanici;
se spomenuti prvi ili spomenuti drugi epitop nalazi na tumorskoj stanici a preostali epitop se nalazi na efektorskoj stanici;
se spomenuti prvi ili drugi epitop nalazi na T stanici, kao što je primjerice na CD3 koji je eksprimiran na T stanicu;
se prvi teški lanac i drugi teški lanac vežu na različite epitope na istoj tumorskoj stanici; ili
se prvi teški lanac veže na epitop na tumorskoj stanici, i preostali teški lanac je od irelevantnog ili neaktivnog protutijela bez ikakve relevantne aktivnosti *in vivo* vezanja za namjeravanu primjenu.
34. Bispecifično protutijelo prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 23 do 33, **naznačeno time, da** su navedeni prvi i drugi epitop lokalizirani na tumorskoj stanici i pritom bispecifično protutijelo ima specifičnost vezanja za cilj odabran iz skupine koju čine: erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD19, CD20, CD4, CD38, CD138, CXCR5, c-Met, HERV-obavijeni protein, periostin, Bigh3, SPARC, BCR, CD79, CD37, EGFRvIII, L1-CAM, AXL, Tkvni faktor (TF), CD74, EpCAM, i MRP3.
35. Bispecifično protutijelo prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 23 do 33, **naznačeno time, da** su navedeni prvi i drugi epitop lokalizirani na tumorskoj stanici i pritom bispecifično protutijelo ima specifičnost vezanja za ciljnu kombinaciju odabranu iz skupine koju čine: erbB1 + erbB2, erbB2 + erbB3, erbB1 + erbB3, CD19 + CD20, CD38 + CD34, CD4 + CXCR5, CD38 + RANKL, CD38 + CXCR4, CD20 + CXCR4, CD20 + CCR7, CD20 + CXCR5, CD20 + RANKL, erbB2 + AXL, erbB1 + cMet, erbB2 + cMet, erbB2 + EpCAM, c-Met + AXL, c-Met + TF, CD38 + CD20, CD38 + CD138.
36. Bispecifično protutijelo prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 23 do 33, **naznačeno time, da** je navedeni prvi ili drugi epitop lokaliziran na tumorskoj stanici i preostali epitop je lokaliziran na efektorskoj stanici, pri čemu bispecifično protutijelo ima specifičnost vezanja za cilj odabran iz skupine koju čine: FcgamaRI (CD64), FcgamaRIII (CD16), CD3, CD89, CD32a, FcεRI.
37. Bispecifično protutijelo prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 23 do 33, **naznačeno time, da** ima specifičnost vezanja za ciljnu kombinaciju odabranu od: CD3 + HER2, CD3 + CD20, IL-12 + IL18, IL-1a + IL-1b, VEGF + EGFR, EpCAM + CD3, GD2 + CD3, GD3 + CD3, HER2 + CD64, EGFR + CD64, CD30 + CD16, NG2 + CD28, HER2 + HER3, CD20 + CD28, HER2 + CD16, Bcl2 + CD3, CD19 + CD3, CEA + CD3, EGFR + CD3, IgE + CD3, EphA2 + CD3, CD33 + CD3, MCSP + CD3, PSMA + CD3, TF + CD3, CD19 + CD16, CD19 + CD16a, CD30 + CD16a, CEA + HSG, CD20 + HSG, MUC1 + HSG, CD20 + CD22, HLA-DR + CD79, PDGFR + VEGF, IL17a + IL23, CD32b + CD25, CD20 + CD38, HER2 + AXL, CD89 + HLA klasa II, CD38 + CD138, TF + cMet, Her2 + EpCAM, HER2 + HER2, EGFR + EGFR, EGFR + c-Met, c-Met + nevezujući krak i kombinacije receptora spojenih G-proteina.
38. Bispecifično protutijelo prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 23 do 37, **naznačeno time, da** je za uporabu kao lijek.

39. Farmaceutski pripravak, **naznačen time, da** sadrži bispecifično protutijelo prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 23 do 37, i farmaceutski prihvatljiv nosač.