



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2560993 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2024.09.23
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2024.06.26
(86)	European Application Nr.	11716882.3
(86)	European Filing Date	2011.04.20
(87)	The European Application's Publication Date	2013.02.27
(30)	Priority	2010.04.20, DK, 201000330 2010.11.24, DK, 201001066 2010.04.20, US, 326082 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, Carl Jacobsens Vej 30, 2500 Valby, Danmark
(72)	Inventor	LABRIJN, Aran, Frank, NL-3584 CT Utrecht, Nederland MEESTERS, Joyce, NL-3522 EC Utrecht, Nederland BREMER, Ewald van den, NL-3584 CT Utrecht, Nederland NEIJSEN, Joost, J., NL-3584 CT Utrecht, Nederland BERKEL, Patrick van, NL-3544 NH Utrecht, Nederland GOEIJ, Bart de, NL-3584 CT Utrecht, Nederland VINK, Tom, NL-6285 az Epen, Nederland VAN DE WINKEL, Jan, NL-3584 CT Utrecht, Nederland SCHUURMAN, Janine, NL-111 CH Diemen, Nederland PARREN, Paul, NL-3984 PR Odijk, Nederland
(74)	Agent or Attorney	ONSAGERS AS, Postboks 1813 Vika, 0123 OSLO, Norge

(54)	Title	HETERODIMERIC ANTIBODY FC-CONTAINING PROTEINS AND METHODS FOR PRODUCTION THEREOF
(56)	References Cited:	EP-A1- 1 870 459 WO-A1-2009/089004 WO-A2-2007/110205 US-A- 5 807 706 WO-A1-2008/119353 WO-A1-2008/145142

WURCH THIERRY ET AL: "Keystone Symposium on Antibodies as Drugs: March 27-April 1, 2009, Whistler, BC CA", MABS, LANDES BIOSCIENCE, US, vol. 1, no. 4, 1 July 2009 (2009-07-01), pages 318 - 325, XP009145415, ISSN: 1942-0870

K. GUNASEKARAN ET AL: "Enhancing Antibody Fc Heterodimer Formation through Electrostatic Steering Effects: APPLICATIONS TO BISPECIFIC MOLECULES AND MONOVALENT IgG", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 285, no. 25, 16 April 2010 (2010-04-16), pages 19637 - 19646, XP055001947, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M110.117382

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, PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, US, vol. 38, no. 1, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 84 - 91, XP009138436, ISSN: 0090-9556, [retrieved on 20091022], DOI: 10.1124/DMD.109.029751

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. *In-vitro*-fremgangsmåte for å generere et bispesifikt antistoff,

der nevnte fremgangsmåte omfatter de følgende trinnene:

- 5 a) tilveiebringe et første homodimert, monospesifikt antistoff som omfatter en immunoglobulin-Fc-region, der nevnte Fc-region omfatter en første CH3-region, der nevnte første monospesifikke antistoff omfatter en Phe i posisjon 405 og en Arg i posisjon 409 i overensstemmelse med EU-nummereringen og en Cys-Pro-Pro-Cys-sekvens i kjernehengsleregionen,
- 10 b) tilveiebringe et andre homodimert, monospesifikt antistoff som omfatter en immunoglobulin-Fc-region, der nevnte Fc-region omfatter en andre CH3-region, der nevnte andre monospesifikke antistoff omfatter en Leu i posisjon 405 og en Lys i posisjon 409 i overensstemmelse med EU-nummereringen og en Cys-Pro-Pro-Cys-sekvens i kjernehengsleregionen,
- 15 c) inkubere nevnte første monospesifikke antistoff sammen med nevnte andre monospesifikke antistoff ved reduserende betingelser som er tilstrekkelig til å tillate at cysteinene i Cys-Pro-pro-Cys-sekvensene i kjernehengsleregionene gjennomgår disulfidbinding-isomerisering, og
- d) oppnå nevnte bispesifikke antistoff,
- 20 der sekvensene i nevnte første og andre CH3-regioner er forskjellige og er slik at den heterodimere interaksjonen mellom nevnte første og andre CH3-regioner er sterkere enn hver av de homodimere interaksjonene til nevnte første og andre CH3-regioner, og der nevnte første monospesifikke antistoff binder til en første epitop og nevnte andre monospesifikke antistoffer binder til en andre epitop, der nevnte første
- 25 og andre epitop er forskjellige.

2. *In-vitro*-fremgangsmåte ifølge krav 1,

der Fc-regionen i det første monospesifikke antistoffet er av en isotype som er valgt fra gruppen som består av IgG1, IgG2, IgG3 og IgG4, og der Fc-regionen i det

andre monospesifikke antistoffet er av en isotype som er valgt fra gruppen som består av IgG1, IgG2, IgG3 og IgG4.

3. *In-vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
 5 der Fc-regionene i både nevnte første og andre monospesifikke antistoffer er av IgG1-isotypen.

4. *In-vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
 der den heterodimere interaksjonen i det resulterende bispesifikke antistoffet er
 10 a) slik at ingen Fab-armutveksling kan forekomme ved 0,5 mM glutation ved betingelsene som er beskrevet i eksempel 13, og/eller
 b) slik at ingen Fab-armutveksling forekommer *in vivo* i mus ved betingelsene som er beskrevet i eksempel 14, og/eller
 c) mer enn to ganger sterkere, slik som mer enn tre ganger sterkere, f.eks.
 15 mer enn fem ganger sterkere enn den sterkeste av de to homodimere interaksjonene, f.eks. når dette bestemmes som beskrevet i eksempel 30.

5. *In-vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
 der sekvensene i nevnte første og andre CH3-regioner er slik at
 20 a) dissosiasjonskonstanten til heterodimerene til det resulterende bispesifikke antistoffet er under 0,05 mikromolar når den undersøkes som beskrevet i eksempel 30, og/eller
 b) dissosiasjonskonstantene til begge homodimerer for det første og andre
 25 monospesifikke antistoffet er over 0,01 mikromolar, slik som over 0,05 mikromolar, fortrinnsvis mellom 0,01 og 10 mikromolar, slik som mellom 0,05 og 10 mikromolar, mer foretrukket mellom 0,01 og 5, slik som mellom 0,05 og 5 mikromolar, enda mer foretrukket mellom 0,01 og 1 mikromolar, slik som mellom 0,05 og 1 mikromolar, mellom 0,01 og

0,5 eller mellom 0,01 og 0,1 mikromolar når de undersøkes som beskrevet i eksempel 21.

6. *In-vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
5 der nevnte første homodimere monospesifikke antistoff ikke har mer enn én aminosyresubstitusjon i CH₃-regionen, og det andre homodimere monospesifikke antistoffet har ikke mer enn én aminosyresubstitusjon i CH₃-regionen relativt villtype-CH₃-regionene.
- 10 7. *In-vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
der nevnte første og andre CH₃-regioner, bortsett fra de spesifiserte mutasjonene, omfatter sekvensen ifølge SEQ ID nr. 1.
8. *In-vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
15 der nevnte første og andre homodimere monospesifikke antistoffer, bortsett fra spesifiserte mutasjoner, er humane eller humaniserte antistoffer.
9. *In-vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
der nevnte første og andre homodimere monospesifikke antistoffer videre omfatter
20 en lettkjede.
10. *In-vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
der nevnte første og/eller nevnte andre homodimere monospesifikke antistoff omfatter en mutasjon som fjerner akseptorsetet for Asn-koblet glykosylering.
25
11. *In-vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
der nevnte første og andre homodimere monospesifikke antistoffer som blir tilveiebrakt i trinn a) og b) blir renset.

12. *In-vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
der nevnte første og/eller nevnte andre homodimere monospesifikke antistoff er
konjugert til et legemiddel, et prolegemiddel eller et toksin eller inneholder en
5 akseptorgruppe for det samme.
13. *In-vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
der nevnte første og/eller nevnte andre epitop er lokalisert på en tumorcelle,
der nevnte første eller nevnte andre epitop er lokalisert på en tumorcelle og den
10 andre epitopen er lokalisert på en effektorcelle,
der nevnte første eller nevnte andre epitop er lokalisert på en T-celle, slik som en
CD3 uttrykt på en T-celle,
der det første antistoffet og det andre antistoffet binder til ulike epitoper på den
samme tumorcellen, eller
15 der det første antistoffet binder til en epitop på en tumorcelle, og det andre
antistoffet er et irrelevant eller inaktivt antistoff uten noen relevant in vivo-
bindingsaktivitet for den tiltenkte applikasjonen.
14. *In-vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
20 der de reduserende betingelsene i trinn c) omfatter tilsetningen av et
reduksjonsmiddel, f.eks. et reduksjonsmiddel som er valgt fra gruppen som består
av: 2-merkaptetylamin, ditioneitol og tris(2-karboksyetyl)fosfin eller kjemiske
derivater derav, ditioneitol, glutation, L-cystein og beta-merkaptetanol.
- 25 15. *In-vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
der trinn c) blir utført ved reduserende betingelser med et redokspotensial mellom -
150 og -600 mV, slik som mellom -250 og -400 mV.
16. *In-vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,

der trinn c) omfatter inkubasjon i minst 90 minutter ved en temperatur på minst 20 °C i nærværet av minst 25 mM 2-merkaptetylamin eller i nærværet av minst 0,5 mM ditiotritol.

- 5 17. *In-vitro*-fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
der trinn d) omfatter fjerning av et reduksjonsmiddel, for eksempel ved avsalting.
18. Fremgangsmåte for seleksjonen av et bispesifikt antistoff som har en ønsket egenskap,
- 10 der nevnte fremgangsmåte omfatter trinnene med å:
 - a) tilveiebringe et første sett med homodimere antistoffer som omfatter antistoffer med ulike variabelregioner og en Cys-Pro-Pro-Cys-sekvens i kjernehengsleregionen, der nevnte antistoffer i nevnte første sett omfatter identiske første CH₃-regioner, der nevnte CH₃-regioner omfatter en Phe i
15 posisjon 405 og en Arg i posisjon 409 i overensstemmelse med EU-nummereringen,
 - b) tilveiebringe et andre sett med homodimere antistoffer som omfatter antistoffer med ulike variabelregioner eller identiske variabelregioner og en Cys-Pro-Pro-Cys-sekvens i kjernehengsleregionen, der nevnte
20 antistoffer i nevnte andre sett omfatter identiske andre CH₃-regioner, der nevnte CH₃-regioner omfatter en Leu i posisjon 405 og en Lys i posisjon 409 i overensstemmelse med EU-nummereringen,
 - c) inkubere kombinasjoner av antistoffer i nevnte første sett og i nevnte andre sett ved reduserende betingelser som er tilstrekkelig til å tillate at
25 cysteinene i hengsleregionene gjennomgår disulfidbinding-isomerisering, for slik å generere et sett med bispesifikke antistoffer,
 - d) eventuelt gjenopprette betingelsene til ikke-reduserende,
 - e) undersøke det resulterende settet med bispesifikke antistoffer for en gitt ønsket egenskap, og
 - 30 f) velge et bispesifikt antistoff som har den ønskede egenskapen;

der sekvensene av nevnte første og andre CH3-regioner er forskjellige og er slik at den heterodimere interaksjonen mellom nevnte første og andre CH3-regioner er sterkere enn hver av de homodimere interaksjonene av nevnte første og andre CH3-regioner, og der nevnte første og andre homodimere antistoffer binder forskjellige epitoper.

19. Fremgangsmåte for fremstilling av et bispesifikt antistoff,

der nevnte fremgangsmåte omfatter de følgende trinn:

- 10 a) tilveiebringe en første nukleinsyrekonstruksjon som koder for et første polypeptid som omfatter en første fullengde-tungkjede for et antistoff som omfatter en første CH3-region som omfatter en Phe i posisjon 405 og en Arg i posisjon 409 i overensstemmelse med EU-nummereringen og som videre omfatter en Cys-Pro-Pro-Cys-sekvens i kjernehengsleregionen,
- 15 b) tilveiebringe en andre nukleinsyrekonstruksjon som koder for et andre polypeptid som omfatter en andre fullengde-tungkjede for et antistoff som omfatter en andre CH3-region som omfatter en Leu i posisjon 405 og en Lys i posisjon 409 i overensstemmelse med EU-nummerering, og som videre omfatter en Cys-Pro-Pro-Cys-sekvens i
- 20 c) sam-uttrykke nevnte første og andre nukleinsyrekonstruksjoner i en vertscelle, og
- d) oppnå nevnte bispesifikke antistoff fra cellekulturen,

der sekvensene til nevnte første og andre CH3-region er forskjellige og er slik at den heterodimere interaksjonen mellom nevnte første og andre CH3-region er sterkere enn hver av de heterodimere interaksjonene til nevnte første og andre CH3-region, og der nevnte første fullengde-tungkjede binder en første epitop og nevnte andre fullengde-tungkjede binder en andre epitop, der nevnte første og andre epitop er forskjellige.

20. Fremgangsmåte ifølge krav 19,

videre omfattende trekkene i ethvert av kravene 2 til 13.

21. Ekspresjonsvektor,
som omfatter nukleinsyrekonstruksjonene som er spesifisert i ethvert av kravene 19
5 til 20.

22. Vertscelle,
som omfatter nukleinsyrekonstruksjonene som er spesifisert i ethvert av kravene 19
10 til 20.

23. Bispesifikt antistoff, som er oppnådd ved eller som kan bli oppnådd ved
fremgangsmåten ifølge ethvert av kravene 1 til 17, 19 eller 20.

24. Bispesifikt antistoff,
15 som omfatter et første polypeptid som omfatter en første fullengde-antistoff-
tungkjede som omfatter en første Fc-region som omfatter en første CH3-region, og
et andre polypeptid som omfatter en andre Fc-region som omfatter en andre
fullengde-antistoff-tungkjede som omfatter en andre CH3-region,
der nevnte første tungkjede binder en første epitop og nevnte andre tungkjede
20 binder en andre epitop, der nevnte første og andre epitoper er forskjellige, og der
sekvensene til nevnte første og andre CH3-regioner er forskjellige og er slik at den
heterodimere interaksjonen mellom nevnte første og andre CH3-regioner er sterkere
enn hver av de heterodimere interaksjonene til nevnte første og andre CH3-region,
og

25 a) der nevnte første CH3-region omfatter en Phe i posisjon 405 og en Arg i
posisjon 409 i overensstemmelse med EU-nummereringen, og en Cys-
Pro-Pro-Cys-sekvens i kjernehengsleregionen, og

- b) der nevnte CH3-region omfatter en Leu i posisjon 405 og en Lys i posisjon 409 i overensstemmelse med EU-nummereringen, og en Cys-Pro-Pro-Cys-sekvens i kjernehengsleregionen.

- 5 25. Bispesifikt antistoff ifølge krav 23 eller krav 24,
der den første Fc-regionen er av en isotype som er valgt fra gruppen som består av IgG1, IgG2, IgG3 og IgG4 og der den andre Fc-regionen er av en isotype som er valgt fra gruppen som består av IgG1, IgG2, IgG3 og IgG4.
- 10 26. Bispesifikt antistoff ifølge ethvert av kravene 23 til 25,
der begge av nevnte første og andre Fc-region er av IgG1-isotypen.
- 15 27. Bispesifikt antistoff ifølge ethvert av kravene 23 til 26,
der nevnte første CH3-region ikke har mer enn én aminosyresubstitusjon, og den andre CH3-regionen har ikke mer enn én aminosyresubstitusjon relativt i forhold til villtype-CH3-regionene.
- 20 28. Bispesifikt antistoff ifølge ethvert av kravene 23 til 27,
der nevnte første og andre CH3-regioner, med unntak av de spesifiserte mutasjonene, omfatter sekvensen ifølge SEQ ID nr. 1.
- 25 29. Bispesifikt antistoff ifølge ethvert av kravene 23 til 28,
der nevnte første og andre fullengde-tungkjeder, med unntak av spesifiserte mutasjoner, er fra et humant eller humanisert antistoff.
30. Bispesifikt antistoff ifølge ethvert av kravene 23 til 29,
videre omfattende to fullengde-lettkjeder.

31. Bispesifikt antistoff ifølge ethvert av kravene 23 til 30,
der nevnte første og/eller andre polypeptid omfatter en mutasjon som fjerner
akseptorsetet for Asn-koblet glykosylering.
- 5 32. Bispesifikt antistoff ifølge ethvert av kravene 23 til 31,
der nevnte første og/eller andre polypeptid er konjugert til et legemiddel, et
prolegemiddel eller et toksin eller inneholder en akseptorgruppe for det samme.
33. Bispesifikt antistoff ifølge ethvert av kravene 23 til 32,
10 der nevnte første og/eller andre epitop er lokalisert på en tumorcelle, der nevnte
første eller andre epitop er lokalisert på en tumorcelle og den andre epitopen er
lokalisert på en effektorcelle,
der nevnte første og andre epitop er lokalisert på en T-celle, slik som på CD3
uttrykt på en T-celle,
15 der den første tungkjeden og den andre tungkjeden binder til ulike epitoper på den
samme tumorcellen, eller
der den første tungkjeden binder en epitop på en tumorcelle, og den andre
tungkjeden er fra et irrelevant eller inaktivt antistoff uten noen relevant in vivo-
bindingsaktivitet for den tiltenkte applikasjonen.
- 20 34. Bispesifikt antistoff ifølge ethvert av kravene 23 til 33,
der nevnte første og andre epitop er lokalisert på en tumorcelle og der det
bispesifikke antistoffet har bindingsspesifisitet for et mål som er valgt fra gruppen
som består av: erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD19, CD20,
25 CD4, CD38, CD138, CXCR5, c-Met, HERV-kappeprotein, periostin, Bigh3,
SPARC, BCR, CD79, CD37, EGFvIII, L1-CAM, AXL, vevsfaktor (TF), CD74,
EpCAM og MRP3.
35. Bispesifikt antistoff ifølge ethvert av kravene 23 til 33,

der nevnte første og andre epitop er lokalisert på en tumorcelle og der nevnte bispesifikke antistoff har bindingsspesifisitet for en målkombinasjon som er valgt fra gruppen som består av: 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 + c-Met, erbB2 + EpCAM, c-Met + AXL, c-Met + TF, CD38 + CD20, CD38 + CD138.

36. Bispesifikt antistoff ifølge ethvert av kravene 23 til 33, der nevnte første eller andre epitop er lokalisert på en tumorcelle og den andre epitopen er lokalisert på en effektorcelle, der det bispesifikke antistoffet har bindingsspesifisitet for et mål som er valgt fra gruppen som består av: FcγRI (CD64), FcγRIII (CD16), CD3, CD89, CD32a, FCεRI.

37. Bispesifikt antistoff ifølge ethvert av kravene 23 til 33, som har bindingsspesifisitet for en målkombinasjon som er valgt fra: CD3 + HER2, CD3 + CD20, IL-12 + IL-18, 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 klasse II, CD38 + CD138, TF + cMet, Her2 + EpCAM, HER2 + HER2, EGFR + EGFR, EGFR + c-Met, c-Met + ikke-bindende arm og kombinasjoner av G-proteinkoblede reseptorer.

38. Bispesifikt antistoff ifølge ethvert av kravene 23 til 37 for anvendelse som et medikament.

39. Farmasøytisk sammensetning som omfatter et bispesifikt antistoff ifølge ethvert av kravene 23 til 37 og en farmasøytisk akseptabel bærer.