



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2911699 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 47/68 (2017.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2018.04.23
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2017.11.15
(86)	European Application Nr.	13786322.1
(86)	European Filing Date	2013.10.23
(87)	The European Application's Publication Date	2015.09.02
(30)	Priority	2012.10.23, EP, 12189604 2013.10.14, EP, 13188607 2012.10.23, US, 201261717187 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
(73)	Proprietor	SynAffix B.V., Molenstraat 110, 5342 CC Oss, NL-Nederland
(72)	Inventor	VAN DELFT, Floris Louis, Bandoengstraat 13, NL-6524 KZ Nijmegen, NL-Nederland VAN GEEL, Remon, Oude Litherweg 137, NL-5346 RS Oss, NL-Nederland WIJDEVEN, Maria Antonia, Rollingstonestraat 145, NL-6663 HR Lent, NL-Nederland
(74)	Agent or Attorney	Zacco Denmark A/S, Arne Jacobsens Allé 15, DK-2300 KØBENHAVN S, Danmark

(54) Title **MODIFIED ANTIBODY, ANTIBODY-CONJUGATE AND PROCESS FOR THE PREPARATION THEREOF**

(56) References Cited: KHIDEKEL N ET AL: "A CHEMOENZYMATIC APPROACH TOWARD THE RAPID AND SENSITIVE DETECTION OF O-GLCNAC POSTTRANSLATIONAL MODIFICATIONS", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, ACS PUBLICATIONS, US, vol. 125, no. 52, 31 December 2003 (2003-12-31), XP008055588, ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/JA038545R, M. PASEK ET AL: "The N-acetyl-binding pocket of N-acetylglucosaminyltransferases also accommodates a sugar analog with a chemical handle at C2", GLYCOBIOLOGY, vol. 22, no. 3, 1 March 2012 (2012-03-01), pages 379-388, XP055061204, ISSN: 0959-6658, DOI: 10.1093/glycob/cwr110, VAN WIJK X M R ET AL: "A 4-deoxy analogue of N-acetyl-d-glucosamine inhibits heparan sulphate expression and growth factor binding in vitro", EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, ACADEMIC PRESS, US, vol. 316, no. 15, 10 September 2010 (2010-09-10), pages 2504-2512, XP027166203, ISSN: 0014-4827 [retrieved on 2010-04-28], WO-A1-2005/056783, WO-A1-2009/025645, WO-A2-2005/051429,

WO-A2-2007/133855, WO-A2-2008/143944, WO-A2-2009/102820, US-A1- 2005 130 235, QASBA PRADMAN K ET AL: "Site-specific linking of biomolecules via glycan residues using glycosyltransferases", BIOTECHNOLOGY PROGRESS,, vol. 24, no. 3, 22 April 2008 (2008-04-22) , pages 520-526, XP009107098, ISSN: 1520-6033, DOI: 10.1021/BP0704034, ELIZABETH BOEGGEMAN ET AL: "Site Specific Conjugation of Fluoroprobes to the Remodeled Fc N-Glycans of Monoclonal Antibodies Using Mutant Glycosyltransferases: Application for Cell Surface Antigen Detection", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 20, no. 6, 17 June 2009 (2009-06-17), pages 1228-1236, XP055061205, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/bc900103p, BOEGGEMAN ELIZABETH ET AL: "Direct identification of nonreducing GlcNAc residues on N-glycans of glycoproteins using a novel chemoenzymatic method", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, ACS, WASHINGTON, DC, US, vol. 18, no. 3, 1 May 2007 (2007-05-01), pages 806-814, XP002474455, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/BC060341N, QASBA PRADMAN K ET AL: "Mutant glycosyltransferases assist in the development of a targeted drug delivery system and contrast agents for MRI", AAPS JOURNAL, AMERICAN ASSOCIATION OF PHARMACEUTICAL SCIENTISTS, US, vol. 8, no. 1, 1 January 2006 (2006-01-01) , pages E190-E195, XP002491763, ISSN: 1550-7416, DOI: 10.1208/AAPSJ080123 [retrieved on 2006-03-24], RAMAKRISHNAN B ET AL: "Structure-based design of beta1,4-galactosyltransferase I (beta4Gal-T1) with equally efficient N-acetylgalactosaminyltransferase activity. Point mutation broadens beta4Gal-T1 donor specificity", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 277, no. 23, 7 June 2002 (2002-06-07) , pages 20833-20839, XP002323111, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M111183200, INKA BROCKHAUSEN ET AL: "UDP-Gal: GlcNAc-R [beta]1,4-galactosyltransferase-a target enzyme for drug design. Acceptor specificity and inhibition of the enzyme", GLYCOCONJUGATE JOURNAL, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, BO, vol. 23, no. 7-8, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 525-541, XP019434746, ISSN: 1573-4986, DOI: 10.1007/S10719-006-7153-X

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/>

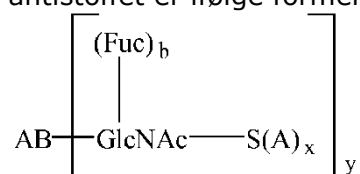
Patentkrav

1. Fremgangsmåte for fremstilling av et antistoff-konjugat, omfattende å reagere et modifisert antistoff med et linker-konjugat, hvori linker-konjugatet omfatter en (hetero)sykloalkynylgruppe og ett eller flere molekyler av interesse, hvori det modifiserte antistoffet er et antistoff omfattende en GlcNAc-S(A)_x-substituent, hvori GlcNAc er et N-acetylglukosamin, hvori S(A)_x er et sukkerderivat omfattende x funksjonelle grupper A hvori A er en azidogruppe, og x er 1, 2, 3 eller 4, hvori GlcNAc-S(A)_x-substituenten er bundet til antistoffet via C1 til GlcNAc-S(A)_x-substituentens N-acetylglukosamin, og hvori GlcNAc-et eventuelt er fukosylert.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, omfattende trinnene:

(i) å bringe et antistoff omfattende en kjerne-N-acetylglukosamin- (GlcNAc-)substituent i kontakt med en forbindelse formel S(A)_x-P i nærvær av en katalysator, hvori kjerne-N-acetylglukosamin-substituenten eventuelt er fukosylert, hvori katalysatoren omfatter et mutant katalytisk domene fra en galaktosyltransferase, hvori S(A)_x er et sukkerderivat omfattende x funksjonelle grupper A, hvori A er en azidogruppe, og x er 1, 2, 3 eller 4, hvori P er valgt fra gruppen bestående av uridindifosfat (UDP), guanosindifosfat (GDP) og cytidindifosfat (CDP),

for å oppnå et modifisert antistoff, hvori et modifisert antistoff er definert som et antistoff omfattende en GlcNAc-S(A)_x-substituent bundet til antistoffet via C1 til GlcNAc-S(A)_x-substituentens N-acetylglukosamin, og hvori det modifiserte antistoffet er ifølge formel (4):



4

hvori:

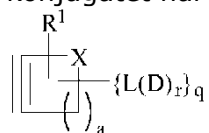
S(A)_x og x er som definert ovenfor; AB representerer et antistoff; GlcNAc er N-acetylglukosamin; Fuc er fukose; b er 0 eller 1; og y er 1 til 20; og

(ii) å reagere det modifiserte antistoffet med et linker-konjugat, hvori linker-konjugatet omfatter en (hetero)sykloalkynylgruppe og ett eller flere molekyler av interesse.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, hvori katalysatoren er en katalysator omfattende et mutant katalytisk domene fra en $\beta(1,4)$ -galaktosyltransferase, foretrukket valgt fra gruppen bestående av GalT Y289L, GalT Y289N, GalT Y289I, GalT Y289F, GalT Y289M, GalT Y289V, GalT Y289G, GalT Y289I og GalT Y289A.

5

4. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 - 3, hvori linker-konjugatet har formelen **(11)** eller **(11b)**:

**11**

hvori:

10

L er en linker;

D er et molekyl av interesse;

r er 1 - 20;

R^1 er uavhengig valgt fra gruppen bestående av hydrogen, halogen, $-\text{OR}^5$, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^5$, C_1 - C_{24} -alkylgrupper, C_6 - C_{24} -(hetero)arylgrupper, C_7 - C_{24} -

15

alkyl(hetero)arylgrupper og C_7 - C_{24} -(hetero)arylalkylgrupper, og hvori alkylgruppene, (hetero)arylgruppene, alkyl(hetero)arylgruppene og

(hetero)arylalkylgruppene eventuelt er substituert, hvori to substituenten R^1 kan være linket sammen for å danne et annelert sykloalkyl eller en annelert

(hetero)arens substituent, og hvori R^5 er uavhengig valgt fra gruppen bestående av hydrogen, halogen, C_1 - C_{24} -alkylgrupper, C_6 - C_{24} -(hetero)arylgrupper, C_7 -

20

C_{24} -alkyl(hetero)arylgrupper og C_7 - C_{24} -(hetero)arylalkylgrupper;

X er $\text{C}(\text{R}^1)_2$, O, S eller NR^2 , hvori R^2 er R^1 eller $\text{L}(\text{D})_r$, og hvori L, D og r er som definert ovenfor;

q er 0 eller 1, med forbehold om at hvis q er 0, er X N- $\text{L}(\text{D})_r$;

25

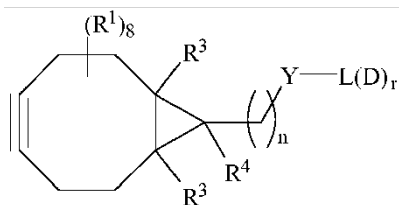
a er 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 eller 8;

a' er 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 eller 8; og

$a+a' < 10$.

5. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 - 4, hvori linker-konjugatet har formelen (17):

30



17

hvori:

R^1 , L, D og r er som definert i krav 4;

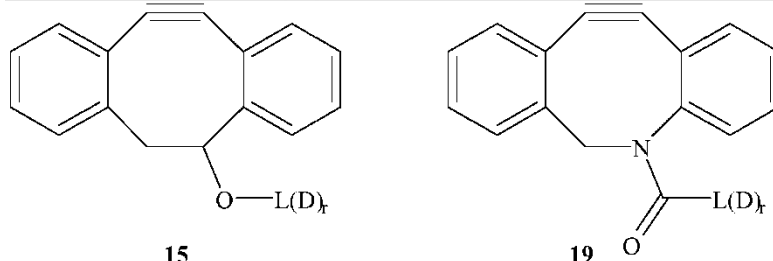
Y er O, S eller NR^2 , hvori R^2 er som definert i krav 4;

5 R^3 er uavhengig valgt fra gruppen bestående av hydrogen, halogen, C_1 - C_{24} -alkylgrupper, C_6 - C_{24} -(hetero)arylgrupper, C_7 - C_{24} -alkyl(hetero)arylgrupper og C_7 - C_{24} -(hetero)arylalkylgrupper;

10 R^4 er valgt fra gruppen bestående av hydrogen, $Y-L(D)_r$, $-(CH_2)_n-Y-L(D)_r$, halogen, C_1 - C_{24} -alkylgrupper, C_6 - C_{24} -(hetero)arylgrupper, C_7 - C_{24} -alkyl(hetero)arylgrupper og C_7 - C_{24} -(hetero)arylalkylgrupper, der alkylgruppene eventuelt er avbrutt av ett eller flere heteroatomer valgt fra gruppen bestående av O, N og S, hvori alkylgruppene, (hetero)arylgruppene, alkyl(hetero)arylgruppene og (hetero)arylalkylgruppene uavhengig eventuelt er substituert; og

15 n er 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 eller 10,

eller hvori linker-konjugatet har formelen (15) eller formelen (19):

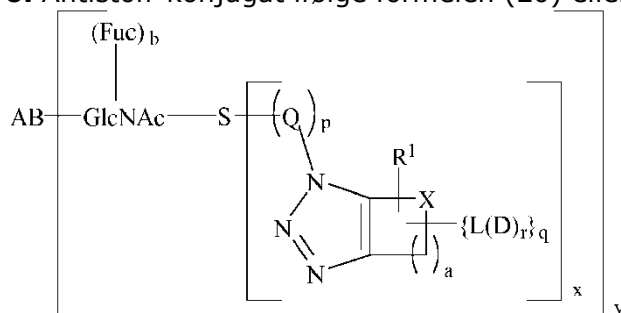


15

19

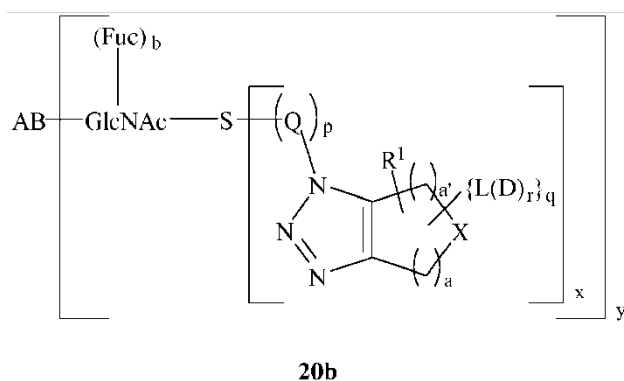
hvori L, D og r er som definert i krav 4.

20 **6.** Antistoff-konjugat ifølge formelen (20) eller (20b):



20

4



hvor:

L, D, X, R¹, a, a', r og q er som definert i krav 5;

b er 0 eller 1;

5 p er 0 eller 1;

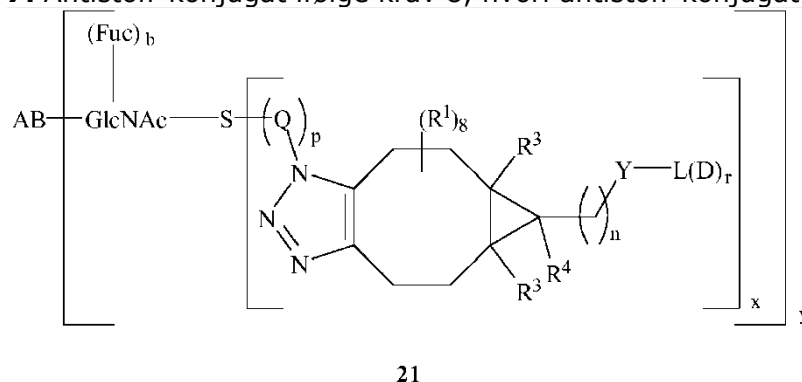
Q er -N(H)C(O)CH₂- eller -CH₂-;

x er 1, 2, 3 eller 4;

y er 1 - 20;

10 og hvori AB er et antistoff, S er sukker eller et sukkerderivat, GlcNAc er N-acetylglukosamin, og Fuc er fukose.

7. Antistoff-konjugat ifølge krav 8, hvori antistoff-konjugatet har formelen **(21)**:

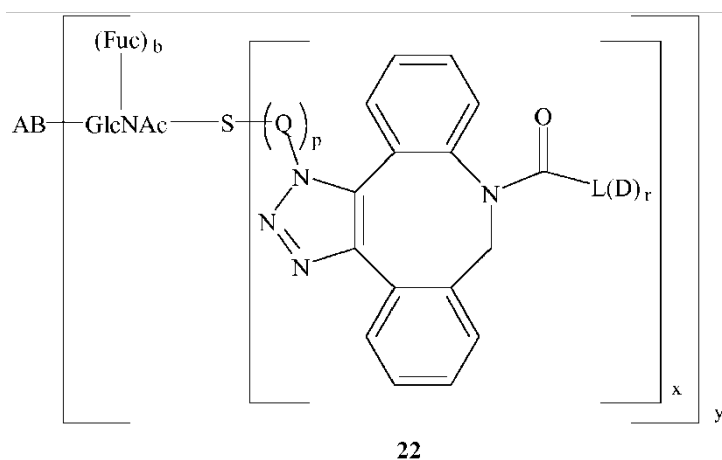
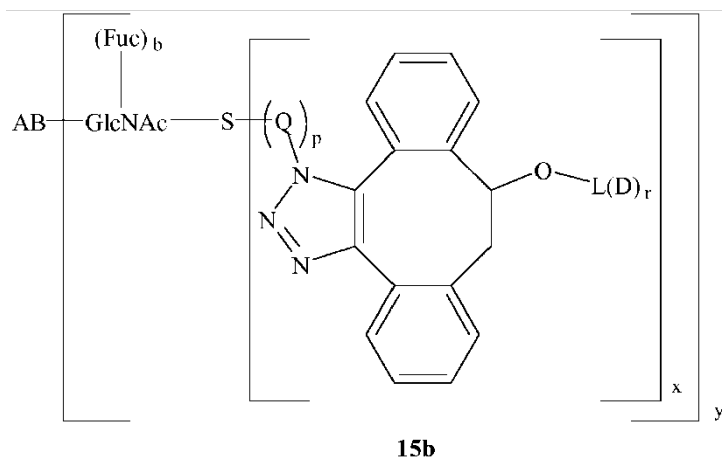


15 hvori AB, L, D, S, Q, x, y, b, p, R¹ og GlcNAc er som definert i krav 6, og

hvor R³, R⁴, Y, n og r er som definert i krav 4

eller hvori antistoff-konjugatet har formelen **(15b)** eller formelen **(22)**:

5



hvor AB, L, D, S, x, y, b, p, Q og GlcNAc er som definert i krav 6.

5

8. Antistoff-konjugat ifølge et hvilket som helst av kravene 6 - 7, hvori molekylet av interesse (D) er valgt fra gruppen bestående av et stoff som er biologisk og/eller farmasøytisk aktivt, et reporter-molekyl, et azid og en (hetero)sykloalkynylgruppe.

10

9. Antistoff-konjugat som kan oppnås ved fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 - 5.

15

10. Antistoff-konjugat ifølge et hvilket som helst av kravene 6 - 9 for anvendelse som medikament.

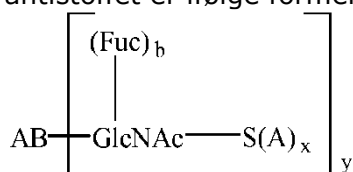
20

11. Antistoff-konjugat ifølge et hvilket som helst av kravene 6 - 9 for anvendelse i behandlingen av kreft, foretrukket brystkreft, mer foretrukket HER2-positiv brystkreft.

12. Fremgangsmåte for fremstilling av et antistoff-legemiddelkonjugat, omfatter trinnene:

(i) å bringe et antistoff omfattende en kjerne-N-acetylglukosamin- (GlcNAc-)substituent i kontakt med en forbindelse med formelen $S(A)_x$ -P i nærvær av en katalysator, hvori kjerne-N-acetylglukosamin-substituenten eventuelt er fukosylert, hvori katalysatoren omfatter et mutant katalytisk domene fra en galaktosyltransferase, hvori $S(A)_x$ er et sukkerderivat omfattende x funksjonelle grupper A hvori A er uavhengig valgt fra gruppen bestående av en azidogruppe, en ketogruppe og en alkynylgruppe, og x er 1, 2, 3 eller 4, hvori P er valgt fra gruppen bestående av uridindifosfat (UDP), guanosindifosfat (GDP) og cytidindifosfat (CDP),

for å oppnå et modifisert antistoff, hvori et modifisert antistoff er definert som et antistoff omfattende en GlcNAc- $S(A)_x$ -substituent bundet til antistoffet via C1 til GlcNAc- $S(A)_x$ -substituentens N-acetylglukosamin, og hvori det modifiserte antistoffet er ifølge formelen (4):



4

hvori:

$S(A)_x$, og x er som definert ovenfor; AB representerer et antistoff; GlcNAc er N-acetylglukosamin; Fuc er fukose; b er 0 eller 1; og y er 1 til 20; og

(ii) å reagere det modifiserte antistoffet med et linker-konjugat, hvori:

(a) når det modifiserte antistoffet er et azidmodifisert antistoff, omfatter linker-konjugatet en (hetero)sykloalkynylgruppe eller en alkynylgruppe og ett eller flere molekyler av interesse; eller

(b) når det modifiserte antistoffet er et ketomodifisert antistoff, omfatter linker-konjugatet en primær amin-gruppe, en aminoksygruppe eller en hydrazinylgruppe og ett eller flere molekyler av interesse; eller

(c) når det modifiserte antistoffet er et alkynmodifisert antistoff, omfatter linker-konjugatet en azidogruppe og ett eller flere molekyler av interesse,

hvori et molekyl av interesse (D) er konjugert til antistoffet via en linker (L); hvori molekylet av interesse er et stoff som er biologisk og/eller farmasøytisk aktivt.

13. Antistoff-legemiddelkonjugat som kan oppnås ved fremgangsmåten ifølge krav 12.

14. Fremgangsmåte for fremstilling av et modifisert antistoff, der fremgangsmåten omfatter:

- 5 (a) deglykosylering av et antistoff-glykan med et kjerne-N-acetylglukosamin, i nærvær av en endoglykosidase, for å oppnå et antistoff omfattende en kjerne-N-acetylglukosaminsubstituent, hvori kjerne-N-acetylglukosaminsubstituenten eventuelt er fukosylert, hvori kjerne-N-acetylglukosaminsubstituenten er bundet via en N-glykosidbinding til amidnitrogenatomet i sidekjeden til en asparaginaminsyre til et antistoff, og hvori endoglykosidasen er Endo S, Endo 10 S49, Endo F eller en kombinasjon derav; etterfulgt av
- (b) å bringe antistoffet i kontakt med en forbindelse med formelen $S(A)_x\text{-P}$ i nærvær av en katalysator, hvori katalysatoren omfatter et mutant katalytisk domene fra en galaktosyltransferase, hvori $S(A)_x$ er et sukkerderivat omfattende 15 x funksjonelle grupper A hvori A er uavhengig valgt fra gruppen bestående av en azidogruppe, en ketogruppe og en alkynylgruppe, og x er 1, 2, 3 eller 4, hvori P er valgt fra gruppen bestående av uridindifosfat (UDP), guanosindifosfat (GDP) og cytidindifosfat (CDP),
- 20 hvori et modifisert antistoff er definert som et antistoff omfattende en GlcNAc- $S(A)_x$ -substituent bundet til antistoffet via C1 til GlcNAc- $S(A)_x$ -substituentens N-acetylglukosamin.