



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2970487 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/245 (2006.01)
C07K 14/25 (2006.01)
C07K 16/08 (2006.01)
C07K 16/20 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2020.07.13
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2020.03.11
(86)	European Application Nr.	14726015.2
(86)	European Filing Date	2014.03.11
(87)	The European Application's Publication Date	2016.01.20
(30)	Priority	2013.03.12, US, 201361777130 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	Molecular Templates, Inc., 9301 Amberglen Boulevard Suite 100, Austin, TX 78729, USA
(72)	Inventor	POMA, Eric, 165 Christopher Street, New YorkNew York 10014, USA WILLERT, Erin, 2230 Mockingbird Drive, Round RockTexas 78681, USA KIM, Jason, 7908 Yaupon Drive, AustinTexas 78759, USA HIGGINS, Jack, 2501 Mesquite Lane, GeorgetownTexas 78628, USA
(74)	Agent or Attorney	ZACCO NORWAY AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Title	CYTOTOXIC PROTEINS COMPRISING CELL-TARGETING BINDING REGIONS AND SHIGA TOXIN A SUBUNIT REGIONS FOR SELECTIVE KILLING OF SPECIFIC CELL TYPES
(56)	References Cited:	WO-A1-2016/196344 BOLOGNESI A ET AL: "A COMPARISON OF ANTI-LYMPHOCYTE IMMUNOTOXINS CONTAINING DIFFERENT RIBOSOME-INACTIVATING PROTEINS AND ANTIBODIES", CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB, vol. 89, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 341-346, XP000606023, ISSN: 0009-9104

- HADDAD J E ET AL: "Minimum Domain of the Shiga Toxin A Subunit Required for Enzymatic Activity", J. BACTERIO., vol. 175, no. 16, 1 August 1993 (1993-08-01), pages 4970-4978, XP008109062,
- Anonymous: "Abstract 1483: MT-3724, an engineered toxin body targeting CD20 for non-Hodgkin's lymphoma | Cancer Research", , 1 January 2016 (2016-01-01), XP055408114, Retrieved from the Internet: URL:http://cancerres.aacrjournals.org/content/76/14_Supplement/1483 [retrieved on 2017-09-19]
- Barbara Windschiegel ET AL: "Lipid Reorganization Induced by Shiga Toxin Clustering on Planar Membranes", PLoS ONE, vol. 4, no. 7, 16 July 2009 (2009-07-16), page e6238, XP055408116, DOI: 10.1371/journal.pone.0006238
- Y. Shiba ET AL: "AGAP2 regulates retrograde transport between early endosomes and the TGN", Journal of Cell Science, vol. 123, no. 14, 15 June 2010 (2010-06-15), pages 2381-2390, XP055119261, ISSN: 0021-9533, DOI: 10.1242/jcs.057778
- Frédéric Mallard ET AL: "Direct Pathway from Early/Recycling Endosomes to the Golgi Apparatus Revealed through the Study of Shiga Toxin B-fragment Transport", The journal of cell biology : JCB, vol. 143, no. 4, 16 November 1998 (1998-11-16), pages 973-990, XP055408120, US ISSN: 0021-9525, DOI: 10.1083/jcb.143.4.973
- C. M. Pirie ET AL: "Convergent Potency of Internalized Gelonin Immunotoxins across Varied Cell Lines, Antigens, and Targeting Moieties", Journal of Biological Chemistry, vol. 286, no. 6, 7 December 2010 (2010-12-07), pages 4165-4172, XP055088620, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M110.186973
- Cizeau et al: "8th Fabisch-Symposium, 3rd Targeted Tumor Therapies, Berlin 2012", , 21 March 2012 (2012-03-21), XP055140853, Retrieved from the Internet: URL:[http://www.charite.de/fabisch/Abstract sText.html](http://www.charite.de/fabisch/Abstract%20Text.html) [retrieved on 2014-09-17]
- GLENNIE ET AL: "Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 44, no. 16, 1 September 2007 (2007-09-01), pages 3823-3837, XP022227562, ISSN: 0161-5890, DOI: 10.1016/J.MOLIMM.2007.06.151
- LAPOINTE P ET AL: "A role for the protease-sensitive loop region of Shiga-like toxin 1 in the retrotranslocation of its A1 domain from the endoplasmic reticulum lumen", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 280, no. 24, 17 June 2005 (2005-06-17), pages 23310-23318, XP002537087, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M414193200 [retrieved on 2005-04-07]
- Jenna Mckenzie ET AL: "Passage through the Golgi is necessary for Shiga toxin B?subunit to reach the endoplasmic reticulum : Shiga toxin in the Golgi", FEBS JOURNAL, vol. 276, no. 6, 1 March 2009 (2009-03-01) , pages 1581-1595, XP055408115, GB ISSN: 1742-464X, DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.06890.x
- M. V. Bujny ET AL: "The retromer component sorting nexin-1 is required for efficient retrograde transport of Shiga toxin from early endosome to the trans Golgi network", JOURNAL OF CELL SCIENCE, vol. 120, no. 12, 22 May 2007 (2007-05-22) , pages 2010-2021, XP055408117, GB ISSN: 0021-9533, DOI: 10.1242/jcs.003111
- M. Maak ET AL: "Tumor-Specific Targeting of Pancreatic Cancer with Shiga Toxin B-Subunit", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, vol. 10, no. 10, 1 October 2011 (2011-10-01), pages 1918-1928, XP055408119, US ISSN: 1535-7163, DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0006
- DANIEL A VALLERA ET AL: "Bioengineering a Unique Deimmunized Bispecific Targeted Toxin That Simultaneously Recognizes Human CD22 and CD19 Receptors in a Mouse Model of B-Cell Metastases", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, AMERICAN ASSOCIATION OF CANCER RESEARCH, US , vol. 9, no. 6 9 June 2010 (2010-06-09), pages 1872-1883, XP002679892, ISSN: 1535-7163, DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0203 Retrieved from the Internet: URL:[http://mct.aacrjournals.org/content/9/ 6/1872](http://mct.aacrjournals.org/content/9/6/1872) [retrieved on 2010-06-08]
- Maria L. Torgersen ET AL: "The A-subunit of surface-bound Shiga toxin stimulates clathrin-dependent uptake of the toxin : Endocytosis of Shiga toxin", FEBS JOURNAL, vol. 272, no. 16, 3 August 2005 (2005-08-03), pages 4103-4113, XP055379368, GB ISSN: 1742-464X, DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.04835.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/>

EP2970487

1

Patentkrav**1.** Cytotoksisk protein omfattende:

a) en immunoglobulintype-bindingsregion:

5 (i) omfattende ett eller flere av: enkeltdomene-antistoffragment, variabelt enkeltkjedet fragment, variabelt antistoffragment, antigen-bindingsfragment og Fd-fragment; og

(ii) er i stand til spesifikt å binde minst ett ekstracellulært målbiomolekyl;

og

10 b) et cytotoksisk Shigatoksin-A-underenhet-effektorpolypeptid omfattende:

en aminosyresekvens som er minst 85 % identisk med aminosyresekvensen vist i SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 eller SEQ ID NO: 3;

eller en aminosyresekvens valgt fra:

(i) aminosyrer 75 til 251 ifølge SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 eller SEQ ID NO: 3;

15 (ii) aminosyrer 1 til 241 ifølge SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 eller SEQ ID NO: 3;

(iii) aminosyrer 1 til 251 ifølge SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 eller SEQ ID NO: 3;

og

(iv) aminosyrer 1 til 261 ifølge SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 eller SEQ ID NO: 3;

20 hvorved etter administrering av det cytotoksiske proteinet til en celle fysisk koblet med et ekstracellulært målbiomolekyl av immunoglobulin-type bindingsregionen, er det cytotoksiske proteinet i stand til å forårsake cellens død.

2. Cytotoksisk protein ifølge krav 1, hvorved etter administrering av det

cytotoksiske proteinet til en første populasjon av celler hvilke elementer er fysisk

25 koblet til ekstracellulære målbiomolekyler av immunoglobulintype-

bindingsregionen, og en andre populasjon av celler hvilke elementer ikke er fysisk

koblet til hvilket som helst ekstracellulært målbiomolekyl av immunoglobulintype-

bindingsregionen, er en cytotoksisk effekt av det cytotoksiske proteinet på

elementer av den første populasjonen av celler i forhold til elementer av den andre

30 populasjonen av celler, minst tre ganger større.

3. Cytotoksisk protein ifølge krav 2, hvori den første populasjonen av celler er

fysisk koblet med det ekstracellulære målbiomolekylet ved hjelp av kovalente

EP2970487

2

og/eller ikke-kovalente intermolekylære interaksjoner som kobler det ekstracellulære målbiomolekylet eller et parti derav, til utsiden av en celle; eller hvori det ekstracellulære målbiomolekylet er et integrert membranprotein eller perifert membranprotein uttrykt ved cellen eller første populasjon av celler.

5

4. Cytotoksisk protein ifølge et hvilket som helst av kravene 1-3, hvori immunoglobulintype-bindingsregionen er i stand til å binde til et ekstracellulært målbiomolekyl valgt fra gruppen bestående av: CD20, CD22, CD40, CD79, CD25, CD30, HER2/neu/ErbB2, EGFR, EphB2, prostataspesifikk membranantigen, Cripto, endoglin, fibroblastaktiveringsprotein, Lewis-Y, CD19, CD21, CS1/ SLAMF7, CD33, CD52, EpCAM, gpA33, mucin, TAG-72, karbonisk anhydrase IX, folatbindingsprotein, gangliosid GD2, gangliosid GD3, gangliosid GM2, gangliosid Lewis-Y2, VEGFR, Alfa V beta3, Alfa5beta1, ErbB1/EGFR, Erb3, c-MET, IGF1R, EphA3, TRAIL-R1, TRAIL-R2, RANKL, tenascin, CD64, mesotelin, BRCA1, MART-1/MelanA, gp100, tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, GAGE-1/2, BAGE, RAGE, NY-ESO-1, CDK-4, beta-katenin, MUM-1, kaspase-8, KIAA0205, HPVE6, SART-1, PRAME, karsinoembryonisk antigen, prostataspesifikt antigen, prostatastamcelleantigen, humant aspartyl (asparaginy) betahydroksylase, EphA2, HER3/ErbB-3, MUC1, tyrosinase-assosiert antigen, HPV-E7, Epstein-Barr-virus-antigen, Bcr-Abl, alfa-fetoproteinantigen, 17-A1, blæretumorantigen, CD38, CD15, CD23, CD53, CD88, CD129, CD183, CD191, CD193, CD244, CD294, CD305, C3AR, FcεR1a, galektin-9, mrp-14, Siglec-8, Siglec-10, CD49d, CD13, CD44, CD54, CD63, CD69, CD123, TLR4, IgE, CD107a, CD203c, CD14, CD68, CD80, CD86, CD105, CD115, F4/80, ILT-3, galektin-3, CD11a-c, GITRL, MHC klasse II, CD284-TLR4, CD107-Mac3, CD195-CCR5, HLA-DR, CD16/32, CD282-TLR2 og hvilket som helst immunogenisk fragment av hvilket som helst av de foregående.

5. Cytotoksisk protein ifølge et hvilket som helst av kravene 1-4, hvori det cytotoksiske Shigatoksin-effektorpolypeptidet omfatter en aminosyresekvens valgt fra:

30

- (i) aminosyrer 75 til 251 ifølge SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 eller SEQ ID NO:3;
- (ii) aminosyrer 1 til 241 ifølge SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 eller SEQ ID NO:3;

EP2970487

3

(iii) aminosyrer 1 til 251 ifølge SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 eller SEQ ID NO:3; og
(iv) aminosyrer 1 til 261 ifølge SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 eller SEQ ID NO:3.

- 5 **6.** Cytotoksisk protein ifølge krav 4, hvori immunoglobulintype-bindingsregionen omfatter sekvensen av aminosyrer 269-508 ifølge SEQ ID NO: 4; eller hvori immunoglobulintype-bindingsregionen omfatter sekvensen av aminosyrer 1-119 ifølge SEQ ID NO: 5, slik som hvori det cytotoksiske proteinet omfatter polypeptidsekvensen ifølge SEQ ID NO: 5.
- 10 **7.** Cytotoksisk protein ifølge et hvilket som helst av kravene 1-6, hvori det cytotoksiske Shigatoksin-effektorpolypeptidet omfatter en mutasjon i forhold til en naturlig forekommende A-underenhet av et element av Shigatoksin-familien som endrer den enzymatiske aktiviteten til Shigatoksin-effektorpolypeptidet samtidig som en cytotoksisk aktivitet opprettholdes; hvori mutasjonen er valgt fra
- 15 minst én aminosyrerestdelesjon eller -substitusjon.
- 8.** Det cytotoksiske proteinet ifølge et hvilket som helst av kravene 1-7, i formen av en homo-multimer eller hetero-multimer.
- 20 **9.** Det cytotoksiske proteinet ifølge et hvilket som helst av kravene 1-8, i formen av et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat.
- 10.** Cytotoksisk protein ifølge et hvilket som helst av kravene 1-9, konjugert til et
- 25 diagnostisk middel.
- 11.** Farmasøytisk sammensetning omfattende et cytotoksisk protein ifølge et hvilket som helst av kravene 1-10 og minst én farmasøytisk akseptabel eksipient eller bærer.
- 30 **12.** Polynukleotid som er i stand til å kode et cytotoksisk protein ifølge et hvilket som helst av kravene 1-7 eller et komplement derav.
- 13.** Ekspresjonsvektor omfattende et polynukleotid ifølge krav 12.

EP2970487

4

14. Transformert vertscelle omfattende et polynukleotid ifølge krav 12 eller en ekspresjonsvektor ifølge krav 13.

5 **15.** *In vitro*-fremgangsmåte for å drepe en celle, der fremgangsmåten omfatter trinnet med å bringe cellen i kontakt med et cytotoxisk protein ifølge et hvilket som helst av kravene 1-10.

10 **16.** *In vitro*-fremgangsmåte for å merke innsiden av en kreftcelle eller immuncelle, der fremgangsmåten omfatter trinnet med å bringe cellen i kontakt med et cytotoxisk protein ifølge krav 10.

15 **17.** Cytotoxisk protein ifølge et hvilket som helst av kravene 1-10 eller en farmasøytisk sammensetning ifølge krav 11 for anvendelse i behandlingen av en sykdom, lidelse eller tilstand hos en pasient.

20 **18.** Det cytotoxiske proteinet eller den farmasøytiske sammensetningen for anvendelse ifølge krav 17, hvori behandlingen er av en sykdom, lidelse eller tilstand valgt fra gruppen bestående av: kreft, tumor, immunlidelse og mikrobiell infeksjon;

slik som hvori kreften er valgt fra gruppen bestående av: benkreft, brystkreft, kreft i sentralt eller perifert nervesystem, gastrointestinal kreft, kjønnsellekreft, kjertelkreft, hode- og nakkekreft, hematologisk kreft, nyre- og urinveiskreft, leverkreft, lunge-/plevrakreft, prostatakreft, sarkom, hudkreft og livmorkreft;

25 eller hvori den immune lidelsen er assosiert med en sykdom valgt fra gruppen bestående av: amyloidose, ankyloserende spondylitt, astma, Crohns sykdom, diabetes, graftavstøting, graft-versus-vert-sykdom, Hashimotos tyroiditt, hemolytisk uremisk sykdom, HIV-relatert sykdom, lupus erytematose, multippel sklerose, polyarteritt, psoriasis, psoriasisisk artritt, revmatoid artritt, sklerodermi,

30 septisk sjokk, Sjögrens syndrom, ulcerøs kolitt og vaskulitt.