



(12) BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication : **MA 40510 B1** (51) Cl. internationale : **C07K 16/28**

(43) Date de publication :
30.08.2019

(21) N° Dépôt :
40510

(22) Date de Dépôt :
03.08.2015

(30) Données de Priorité :
04.08.2014 EP 14179764

(86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT:
PCT/EP2015/067776 03.08.2015

(86) N° de dépôt auprès de l'organisme de validation:EP15742329.4

(71) Demandeur(s) :
F. Hoffmann-La Roche AG, Grenzacherstrasse 124 4070 Basel (CH)

(72) Inventeur(s) :
KLEIN, Christian ; BACAC, Marina ; JAEGER, Christiane ; REGULA, Joerg Thomas ; SCHAEFER, Wolfgang ; AST, Oliver ; KLOSTERMANN, Stefan ; MOLHOJ, Michael ; IMHOF-JUNG, Sabine ; UMAÑA, Pablo

(74) Mandataire :
SABA & CO. TMP

(54) Titre : **MOLÉCULES BISPÉCIFIQUES DE LIAISON À L'ANTIGÈNE ACTIVANT LES LYMPHOCYTES T**

(57) Abrégé : La présente invention concerne de manière générale de nouvelles molécules bispécifiques de liaison à l'antigène destinées à activer les lymphocytes T et à les rediriger vers des cellules cibles spécifiques. De plus, la présente invention concerne des polynucléotides codant ces molécules bispécifiques de liaison à l'antigène, ainsi que des vecteurs et des cellules hôtes comprenant ces polynucléotides. L'invention concerne par ailleurs des méthodes pour produire les molécules bispécifiques de liaison à l'antigène, et des méthodes pour les utiliser dans le traitement de maladies.

MOLÉCULES BISPÉCIFIQUES DE LIAISON À L'ANTIGÈNE ACTIVANT LES
LYMPHOCYTES T

Revendications

1. Molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T comprenant
 - 5 a) une première molécule Fab qui se lie spécifiquement à un premier antigène ;
 - b) une deuxième molécule Fab qui se lie spécifiquement à un second antigène, et dans laquelle les domaines variables VL et VH de la chaîne légère Fab et de la chaîne lourde Fab sont remplacés l'un par l'autre ;
 - c) une troisième molécule Fab qui se lie spécifiquement au premier antigène ; et
 - 10 d) un domaine Fc composé d'un premier et d'un second sous-motif capables d'une association stable ;

dans laquelle le premier antigène est un antigène de cellule cible et le second antigène est un antigène de lymphocytes T activateur, en particulier CD3, plus particulièrement CD3 epsilon ;

- 15 dans laquelle la troisième molécule Fab sous c) est identique à la première molécule Fab sous a) ;

dans laquelle dans le domaine constant CL de la première molécule Fab sous a) et de la troisième molécule Fab sous c) l'acide aminé en position 124 est substitué par une lysine (K) (numérotation selon Kabat) et l'acide aminé en position 123 est substitué par

- 20 une arginine (R) ou une lysine (K) (numérotation selon Kabat), et dans laquelle dans le domaine constant CH1 de la première molécule Fab sous a) et de la troisième molécule Fab sous c) l'acide aminé en position 147 est substitué par un acide glutamique (E) (numérotation selon l'indice EU de Kabat) et l'acide aminé en position 213 est substitué
- 25 par un acide glutamique (E) (numérotation selon l'indice EU de Kabat) ; et dans laquelle le domaine Fc est un domaine Fc d'IgG, et dans laquelle

dans le domaine CH3 du premier sous-motif du domaine Fc un résidu d'acide aminé est remplacé par un résidu d'acide aminé ayant un plus grand volume de chaîne latérale, générant ainsi une protubérance au sein du domaine CH3 du premier sous-motif qui peut

être positionnée dans une cavité au sein du domaine CH3 du second sous-motif, et dans le domaine CH3 du second sous-motif du domaine Fc un résidu d'acide aminé est remplacé par un résidu d'acide aminé ayant un plus petit volume de chaîne latérale, générant ainsi une cavité au sein du domaine CH3 du second sous-motif au sein de laquelle la protubérance au sein du domaine CH3 du premier sous-motif peut être positionnée ; et

dans laquelle

(i) la première molécule Fab sous a) est fusionnée au niveau de la terminaison C de la chaîne lourde Fab à la terminaison N de la chaîne lourde Fab de la deuxième molécule Fab sous b), et la deuxième molécule Fab sous b) et la troisième molécule Fab sous c) sont chacune fusionnées au niveau de la terminaison C de la chaîne lourde Fab à la terminaison N de l'un des sous-motifs du domaine Fc sous d), ou

(ii) la deuxième molécule Fab sous b) est fusionnée au niveau de la terminaison C de la chaîne lourde Fab à la terminaison N de la chaîne lourde Fab de la première molécule Fab sous a), et la première molécule Fab sous a) et la troisième molécule Fab sous c) sont chacune fusionnées au niveau de la terminaison C de la chaîne lourde Fab à la terminaison N de l'un des sous-motifs du domaine Fc sous d).

2. Molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T selon la revendication 1, dans laquelle la molécule Fab qui se lie spécifiquement à CD3 comprend la région 1 déterminant la complémentarité (CDR 1) de chaîne lourde de SEQ ID NO: 4, la CDR 2 de chaîne lourde de SEQ ID NO: 5, la CDR 3 de chaîne lourde de SEQ ID NO: 6, la CDR 1 de chaîne légère de SEQ ID NO: 8, la CDR 2 de chaîne légère de SEQ ID NO: 9 et la CDR 3 de chaîne légère de SEQ ID NO: 10.
3. Molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T selon les revendications 1 ou 2, dans laquelle la molécule Fab qui se lie spécifiquement à CD3 comprend une région variable de chaîne lourde comprenant une séquence d'acides aminés qui est au moins environ 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % ou 100 % identique à la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 3 et une région variable de chaîne légère comprenant une séquence d'acides aminés qui est au moins environ 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % ou 100 % identique à la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 7.

4. Molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans laquelle l'antigène de cellule cible est CD20 et la molécule Fab qui se lie spécifiquement à l'antigène de cellule cible comprend la région 1 déterminant la complémentarité (CDR 1) de chaîne lourde de SEQ ID NO: 46,
5 la CDR 2 de chaîne lourde de SEQ ID NO: 47, la CDR 3 de chaîne lourde de SEQ ID NO: 48, la CDR 1 de chaîne légère de SEQ ID NO: 49, la CDR 2 de chaîne légère de SEQ ID NO: 50 et la CDR 3 de chaîne légère de SEQ ID NO: 51.
5. Molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans laquelle l'antigène de cellule cible est CD20 et
10 la molécule Fab qui se lie spécifiquement à l'antigène de cellule cible comprend une région variable de chaîne lourde comprenant une séquence d'acides aminés qui est au moins environ 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % ou 100 % identique à la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 30 et une région variable de chaîne légère comprenant une séquence d'acides aminés qui est au moins environ 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % ou
15 100 % identique à la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 31.
6. Molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans laquelle la première molécule Fab sous a) et la troisième molécule Fab sous c) comprennent chacune une région variable de chaîne lourde comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 30 et une région variable
20 de chaîne légère comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 31.
7. Molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans laquelle la deuxième molécule Fab sous b) comprend une région variable de chaîne lourde comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 3 et une région variable de chaîne légère comprenant la séquence d'acides
25 aminés de SEQ ID NO: 7.
8. Molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans laquelle le domaine Fc est un domaine Fc d'IgG₁ ou d'IgG₄.
9. Molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T selon l'une
30 quelconque des revendications 1 à 8, dans laquelle le domaine Fc est un domaine Fc humain.

10. Molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans laquelle ledit résidu d'acide aminé ayant un plus gros volume de chaîne latérale est choisi dans le groupe constitué par l'arginine (R), la phénylalanine (F), la tyrosine (Y) et le tryptophane (W), et ledit résidu d'acide aminé ayant un plus petit volume de chaîne latérale est choisi dans le groupe constitué par l'alanine (A), la sérine (S), la thréonine (T) et la valine (V).
5
11. Molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, dans laquelle, dans le domaine CH3 du premier sous-motif du domaine Fc, le résidu thréonine en position 366 est remplacé par un résidu tryptophane (T366W), et, dans le domaine CH3 du second sous-motif du domaine Fc, le résidu tyrosine en position 407 est remplacé par un résidu valine (Y407V), et éventuellement, dans le second sous-motif du domaine Fc en outre le résidu thréonine en position 366 est remplacé par un résidu sérine (T366S) et le résidu leucine en position 368 est remplacé par un résidu alanine (L368A) (numérotations selon l'indice EU de Kabat).
10
12. Molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, dans laquelle, dans le premier sous-motif du domaine Fc en outre le résidu sérine en position 354 est remplacé par un résidu cystéine (S354C) ou le résidu acide glutamique en position 356 est remplacé par un résidu cystéine (E356C), et, dans le second sous-motif du domaine Fc, en outre le résidu tyrosine en position 349 est remplacé par un résidu cystéine (Y349C) (numérotations selon l'indice EU de Kabat).
15
20
13. Molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, dans laquelle le premier sous-motif du domaine Fc comprend des substitutions d'acides aminés S354C et T366W, et le second sous-motif du domaine Fc comprend des substitutions d'acides aminés Y349C, T366S, L368A et Y407V (numérotation selon l'indice EU de Kabat).
25
14. Molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, dans laquelle le domaine Fc présente une affinité de liaison à un récepteur Fc réduite et/ou une fonction effectrice réduite, par comparaison à un domaine Fc d'IgG₁ native.
30
15. Molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T selon l'une

- quelconque des revendications 1 à 14, dans laquelle le domaine Fc comprend une ou plusieurs substitutions d'acide aminé qui réduisent la liaison à un récepteur Fc et/ou la fonction effectrice.
16. Molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T selon l'une
5 quelconque des revendications 1 à 15, dans laquelle ladite ou lesdites substitutions d'acide aminé se trouvent en une ou plusieurs positions sélectionnées dans le groupe de L234, L235 et P329 (numérotation selon l'indice EU de Kabat).
17. Molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T selon l'une
10 quelconque des revendications 1 à 16, dans laquelle chaque sous-motif du domaine Fc comprend trois substitutions d'acide aminé qui réduisent la liaison à un récepteur Fc activateur et/ou la fonction effectrice dans laquelle lesdites substitutions d'acide aminé sont L234A, L235A et P329G (numérotation selon l'indice EU de Kabat).
18. Molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T selon l'une
15 quelconque des revendications 1 à 17, dans laquelle le récepteur Fc est un récepteur Fc γ .
19. Molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T selon l'une
20 quelconque des revendications 1 à 18, dans laquelle la fonction effectrice est une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC).
20. Polynucléotide ou polynucléotides isolés codant pour la molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T selon l'une quelconque des revendications 1 à 19.
21. Vecteur ou vecteurs, en particulier vecteur d'expression, comprenant le ou les
20 polynucléotides selon la revendication 20.
22. Cellule hôte comprenant le ou les polynucléotides selon la revendication 20 ou le ou les vecteurs selon la revendication 21.
23. Procédé de production d'une molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les
25 lymphocytes T selon la revendication 1 et pouvant se lier spécifiquement à CD3 et à un antigène de cellule cible, comprenant les étapes de a) mise en culture de la cellule hôte selon la revendication 22 dans des conditions appropriées pour l'expression de la molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T et b) récupération de la molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T.

24. Composition pharmaceutique comprenant la molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T selon l'une quelconque de revendications 1 à 19 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
- 5 25. Molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou composition pharmaceutique selon la revendication 24 pour une utilisation comme médicament.
- 10 26. Molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou composition pharmaceutique selon la revendication 24 pour une utilisation dans le traitement d'une maladie chez un individu en ayant besoin.
- 15 27. Molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou composition pharmaceutique selon la revendication 24 pour une utilisation dans le traitement d'une maladie chez un individu en ayant besoin comprenant en outre l'administration à l'individu d'une quantité thérapeutiquement efficace d'au moins un agent thérapeutique supplémentaire.
28. Molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T selon les revendications 1 à 19 ou composition pharmaceutique selon la revendication 24 pour l'utilisation selon les revendications 25 à 27, dans laquelle la maladie est un cancer.
- 20 29. Molécule bispécifique de liaison à l'antigène activant les lymphocytes T selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 pour le traitement d'une maladie chez un individu en ayant besoin.