

(12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 44207 B1**
- (51) Cl. internationale : **A61K 47/48; C07K 16/30; C07K 16/28; A61K 49/00**
- (43) Date de publication : **30.11.2020**
-
- (21) N° Dépôt : **44207**
- (22) Date de Dépôt : **17.06.2016**
- (30) Données de Priorité : **19.06.2015 US 201562182020 P**
- (86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT: **PCT/US2016/038041 17.06.2016**
- (86) N° de dépôt auprès de l'organisme de validation: EP16736952.9
- (71) Demandeur(s) : **Eisai R&D Management Co., Ltd., 6-10, Koishikawa 4-chome, Bunkyo-ku Tokyo 112-8088 (JP)**
- (72) Inventeur(s) : **SPIDEL, Jared ; ALBONE, Earl ; GRASSO, Luigi ; KLINE, James, Bradford**
- (74) Mandataire : **H&H IP LAW FIRM**
-
- (54) Titre : **IMMUNOGLOBULINES CONJUGUÉES CYS80**
- (57) Abrégé : La présente invention concerne des procédés de génération d'immunoglobulines conjuguées, le procédé comprenant : le décoiffage d'une cystéine à la position d'acide aminé 80 ("Cys80") dans une région variable de chaîne légère d'une immunoglobuline, l'immunoglobuline comprenant une région variable de chaîne lourde et la région variable de chaîne légère ; et la conjugaison d'un composé réactif avec thiol avec Cys80, le composé réactif avec thiol comprenant un groupe réactif avec thiol. L'invention concerne en outre des molécules de liaison d'antigène et des procédés de génération de celles-ci, des immunoglobulines ainsi que des molécules d'acide nucléique codant pour les immunoglobulines et des cellules hôtes comprenant les molécules d'acide nucléique, des immunoglobulines conjuguées, et des régions variables de chaîne légère pour utilisation dans une immunoglobuline conjuguée.

Revendications

1. Procédé de génération d'une immunoglobuline conjuguée, le procédé comprenant:
 - le décoiffage d'une cystéine à la position d'acide aminé 80 (« Cys80 ») dans une région variable de chaîne légère d'une immunoglobuline dérivée du lapin, la Cys80 basée sur le système de numérotation de Kabat ou de Chothia, dans lequel l'immunoglobuline comprend une région variable de chaîne lourde et la région variable de chaîne légère ; et
 - la conjugaison d'un composé réactif avec thiol à la Cys80, dans lequel le composé réactif avec thiol comprend un groupe réactif avec thiol.
2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le décoiffage comprend l'incubation de l'immunoglobuline avec un tampon de réduction suivie de l'incubation de l'immunoglobuline avec un tampon d'oxydation.
3. Procédé selon la revendication 2, dans lequel le procédé comprend en outre l'immobilisation de l'immunoglobuline sur une matrice avant l'incubation à l'aide du tampon de réduction et l'éluion de l'immunoglobuline de la matrice après l'incubation à l'aide du tampon d'oxydation.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel
 - (a) le composé réactif avec thiol est lié à un agent fonctionnel, dans lequel l'agent fonctionnel comprend un fluorophore, un colorant fluorescent, un polypeptide, une immunoglobuline, un antibiotique, un acide nucléique, un radionucléide, un lieu chimique, une petite molécule, un chélateur, un lipide ou un médicament, et/ou
 - (b) le composé réactif avec thiol est lié à un second composé réactif avec thiol, le second composé réactif avec thiol étant lié à une seconde immunoglobuline comportant une seconde région variable de chaîne lourde et une seconde région variable de chaîne légère, la seconde région variable de chaîne légère comportant une cystéine en position d'acide aminé 80 (« Cys80² »), la Cys80² basée sur le système de numérotation de Kabat ou de Chothia, dans lequel le second composé réactif avec thiol comprend un second groupe réactif avec thiol lié à la Cys80², et/ou
 - (c) la Cys80 est non appariée, et/ou
 - (d) le procédé comprend en outre la substitution d'un acide aminé en position 83 par un résidu d'acide aminé autre que Phe, Lys ou Cys, position 83 sur la base du système de numérotation de Kabat ou de Chothia.
5. Procédé de génération d'une molécule de liaison d'antigène, le procédé comprenant l'incubation d'une première immunoglobuline conjuguée à une seconde immunoglobuline conjuguée afin de générer la molécule de liaison d'antigène, dans lequel:
 - la première immunoglobuline conjuguée comprend une première région variable de

chaîne lourde et une première région variable de chaîne légère, la première région variable de chaîne légère comportant une cystéine en position 80 (« Cys80¹ »), dans lequel la Cys80¹ est conjuguée à un premier composé réactif avec thiol comprenant un premier groupe réactif avec thiol, et dans lequel l'immunoglobuline est dérivée du lapin et la Cys80¹ est basée sur le système de numérotation de Kabat ou de Chothia ; et

la seconde immunoglobuline conjuguée comprend une seconde région variable de chaîne lourde et une seconde région variable de chaîne légère, la seconde région variable de chaîne légère comportant une cystéine en position 80 (« Cys80² »), dans lequel la Cys80² est conjuguée à un second composé réactif avec thiol comprenant un second groupe réactif avec thiol, et dans lequel l'immunoglobuline est dérivée du lapin et la Cys80² est basée sur le système de numérotation de Kabat ou de Chothia.

6. Procédé selon la revendication 5, dans lequel
 - (a) la Cys80¹, la Cys80² ou les deux, ne sont pas appariées, et/ou
 - (b) le procédé comprend en outre, avant l'étape d'incubation, le décoiffage de la Cys80¹, de la Cys80² ou des deux; et
la conjugaison d'un premier composé réactif avec thiol à la Cys80¹, d'un second composé réactif avec thiol à la Cys80², ou des deux, dans lequel le premier composé réactif avec thiol comprend un premier groupe réactif avec thiol et le second composé réactif avec thiol comprend un second groupe réactif avec thiol.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 6, dans lequel
 - (a) le premier composé réactif avec thiol comprend en outre un premier agent fonctionnel, le second composé réactif avec thiol comprend en outre un second agent fonctionnel, ou les deux, et/ou
 - (b) la première immunoglobuline est une première Fab, la seconde immunoglobuline est une seconde Fab, ou les deux, et/ou
 - (c) le procédé comprend en outre la substitution d'un acide aminé en position 83 de la première région variable de chaîne légère par un résidu d'acide aminé autre que Phe, Lys ou Cys, la substitution d'un acide aminé en position 83 de la seconde région variable de chaîne légère par un résidu d'acide aminé autre que Phe, Lys ou Cys, ou les deux.
8. Molécule de liaison d'antigène produite selon le procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 7.
9. Immunoglobuline dérivée du lapin comprenant une région variable de chaîne lourde et une région variable de chaîne légère, la région variable de chaîne légère comportant une cystéine en position 80 (« Cys80 »), dans laquelle la Cys80 est non appariée, et un acide

aminé autre que Phe, Lys ou Cys en position 83, et dans laquelle la Cys80 et la position 83 sont basées sur le système de numérotation de Kabat ou de Chothia.

10. Immunoglobuline selon la revendication 9, dans laquelle la Cys80 est décoiffée.
11. Immunoglobuline selon la revendication 9 ou 10:
 - (A) l'immunoglobuline immuno se liant spécifiquement au CA9 humain et comprenant :
 - a. une région variable de chaîne lourde comprenant les acides aminés 20 à 141 de xil55D5HC (SEQ ID N°: 52) et une région variable de chaîne légère comprenant les acides aminés 20 à 130 de xil55D5LC (SEQ ID N°: 78);
 - b. une région variable de chaîne lourde comprenant les acides aminés 20 à 144 de zu155D5HC (SEQ ID N°: 54) et une région variable de chaîne légère comprenant les acides aminés 20 à 130 de zu155D5LC-3 (SEQ ID N°: 84), zu155D5LC-4 (SEQ ID N°: 86), zu155D5LC-5 (SEQ ID N°: 88), zu155D5LC-6 (SEQ ID N°: 90), zu155D5LC-7 (SEQ ID N°: 92), zu155D5LC-huVK2-40 (SEQ ID N°: 96), zu155D5LC-huVK4-1 (SEQ ID N°: 100), zu155D5LC-huVK6-21 (SEQ ID N°: 102), zu155D5LC-huVK6D-41 (SEQ ID N°: 104); ou zu155D5LC-huVK7-3-Glu81 (SEQ ID N°: 106);
 - c. une région variable de chaîne lourde comprenant les acides aminés 20 à 138 de xilE4HC (SEQ ID N°: 58) et une région variable de chaîne légère comprenant les acides aminés 20 à 130 de xilE4LC (SEQ ID N°: 110);
 - d. une région variable de chaîne lourde comprenant les acides aminés 20 à 140 de zu1E4HC (SEQ ID N°: 60) et une région variable de chaîne légère comprenant les acides aminés 20 à 130 de zu1E4LC-CXXA (SEQ ID N°: 114);
 - e. une région variable de chaîne lourde comprenant les acides aminés 20 à 142 de xil66B3HC (SEQ ID N°: 74) et une région variable de chaîne légère comprenant les acides aminés 20 à 130 de xil66B3LC (SEQ ID N°: 132); ou
 - f. une région variable de chaîne lourde comprenant les acides aminés 20 à 145 de zu166B3HC (SEQ ID N°: 76) et une région variable de chaîne légère comprenant les acides aminés 20 à 130 de zu166B3LC-CXXA (SEQ ID N°: 136), ou
 - (B) l'immunoglobuline immuno se lie spécifiquement au CA9 humain et comprend:
 - a. une chaîne lourde CDR1, CDR2 et CDR3 de xil55D5HC comme indiqué dans SEQ ID N°: 146, 148 et 150, respectivement, et une chaîne légère CDR1, CDR2 et CDR3 de xil55D5LC comme indiqué dans SEQ ID N°: 224, 226 et 228, respectivement ;
 - b. une chaîne lourde CDR1, CDR2 et CDR3 de zu155D5HC comme indiqué dans SEQ ID N°: 152, 154 et 156, respectivement, et une chaîne légère CDR1, CDR2 et CDR3 de zu155D5LC-3 comme indiqué dans SEQ ID N°: 242, 244 et

- 246, respectivement, zu155D5LC-4, comme indiqué dans SEQ ID N°: 248, 250 et 252, respectivement, zu155D5LC-5, comme indiqué dans SEQ ID N°: 254, 256 et 258, respectivement, zu155D5LC-6, comme indiqué dans SEQ ID N°: 260, 262 et 264, respectivement, zu155D5LC-7, comme indiqué dans SEQ ID N°: 266, 268 et 270, respectivement, zu155D5LC-huVK2-40, comme indiqué dans SEQ ID N°: 278, 280 et 282, respectivement, zu155D5LC-huVK4-1, comme indiqué dans SEQ ID N°: 290, 292 et 294, respectivement, zu155D5LC-huVK6-21, comme indiqué dans SEQ ID N°: 296, 298 et 300, respectivement, zu155D5LC-huVK6D-41, comme indiqué dans SEQ ID N°: 302, 304 et 306, respectivement ; ou zu155D5LC-huVK7-3-Glu81 comme indiqué dans SEQ ID N°: 308, 310 et 312, respectivement ;
- c. une chaîne lourde CDR1, CDR2 et CDR3 de xilE4HC comme indiqué dans SEQ ID N°: 164, 166 et 168, respectivement, et une chaîne légère CDR1, CDR2 et CDR3 dans le xilE4LC comme indiqué dans SEQ ID N°: 320, 322 et 324, respectivement ;
- d. une chaîne lourde CDR1, CDR2 et CDR3 de zu1E4HC comme indiqué dans SEQ ID N°: 170, 172 et 174, respectivement, et une chaîne légère CDR1, CDR2 et CDR3 de zu1E4LC-CXXA comme indiqué dans SEQ ID N°: 332, 334 et 336, respectivement ;
- e. une chaîne lourde CDR1, CDR2 et CDR3 de xil66B3HC comme indiqué dans SEQ ID N°: 212, 214 et 216, respectivement, et une chaîne légère CDR1, CDR2 et CDR3 de xil66B3LC comme indiqué dans SEQ ID N°: 386, 388 et 390, respectivement ; ou
- f. une chaîne lourde CDR1, CDR2 et CDR3 de zu166B3HC comme indiqué dans SEQ ID N°: 218, 220 et 222, respectivement, et une chaîne légère CDR1, CDR2 et CDR3 de zu166B3LC-CXXA comme indiqué dans SEQ ID N°: 398, 400 et 402, respectivement, ou
- (C) l'immunoglobuline immuno se lie spécifiquement au TEM1 humain et comprend une région variable de chaîne lourde comprenant les acides aminés 20 à 139 de xil-55-2HC (SEQ ID N°: 56) et une région variable de chaîne légère comprenant les acides aminés 20 à 129 de xil-55-2LC (SEQ ID N°: 108), ou
- (D) l'immunoglobuline immuno se lie spécifiquement au TEM1 humain et comprend une chaîne lourde CDR1, CDR2 et CDR3 de xil-55-2HC comme indiqué dans SEQ ID N°: 158, 160 et 162, respectivement, et une chaîne légère CDR1, CDR2 et CDR3 de xil-55-2LC comme indiqué dans SEQ ID N°: 314, 316 et 318, respectivement, ou
- (E) l'immunoglobuline immuno se lie spécifiquement à la mésothéline humaine et comprend:
- a. une région variable de chaîne lourde comprenant les acides aminés 20 à 142 de xi33011HC (SEQ ID N°: 62) et une région variable de chaîne légère

- comprenant les acides aminés 20 à 131 de xi33011LC (SEQ ID N°: 116);
- b. une région variable de chaîne lourde comprenant les acides aminés 20 à 145 de zu33011HC (SEQ ID N°: 64) et une région variable de chaîne légère comprenant les acides aminés 20 à 131 de zu33011LC-CXXA (SEQ ID N°: 120) ou zu33011LC-CXXI (SEQ ID N°: 122);
 - c. une région variable de chaîne lourde comprenant les acides aminés 20 à 137 de xi324O5HC (SEQ ID N°: 66) et une région variable de chaîne légère comprenant les acides aminés 20 à 127 de xi324O5LC (SEQ ID N°: 124);
 - d. une région variable de chaîne lourde comprenant les acides aminés 20 à 137 de xil78F16HC (SEQ ID N°: 68) et une région variable de chaîne légère comprenant les acides aminés 20 à 127 de xil78F16LC (SEQ ID N°: 126);
 - e. une région variable de chaîne lourde comprenant les acides aminés 20 à 132 de xi237N18HC (SEQ ID N°: 70) et une région variable de chaîne légère comprenant les acides aminés 20 à 127 de xi237N18LC (SEQ ID N°: 128); ou
 - f. une région variable de chaîne lourde comprenant les acides aminés 20 à 137 de xi383I18HC (SEQ ID N°: 72) et une région variable de chaîne légère comprenant les acides aminés 20 à 127 de xi383I18LC (SEQ ID N°: 130), ou
- (F) l'immunoglobuline immuno se lie spécifiquement à la mésothéline humaine et comprend:
- a. une chaîne lourde CDR1, CDR2 et CDR3 de xi33011HC comme indiqué dans SEQ ID N°: 176, 178 et 180, respectivement, et une chaîne légère CDR1, CDR2 et CDR3 de xi33011LC comme indiqué dans SEQ ID N°: 338, 340 et 342, respectivement ;
 - b. une chaîne lourde CDR1, CDR2 et CDR3 de zu33011HC comme indiqué dans SEQ ID N°: 182, 184 et 186, respectivement, et une chaîne légère CDR1, CDR2 et CDR3 de zu33011LC-CXXA comme indiqué dans SEQ ID N°: 350, 352 et 354, respectivement, ou zu33011LC-CXXI comme indiqué dans SEQ ID N°: 356, 358 et 360, respectivement ;
 - c. une chaîne lourde CDR1, CDR2 et CDR3 de xi324O5HC comme indiqué dans SEQ ID N°: 188, 190 et 192, respectivement, et une chaîne légère CDR1, CDR2 et CDR3 de xi324O5LC comme indiqué dans SEQ ID N°: 362, 364 et 366, respectivement ;
 - d. une chaîne lourde CDR1, CDR2 et CDR3 de xil78F16HC comme indiqué dans SEQ ID N°: 194, 196 et 198, respectivement, et une chaîne légère CDR1, CDR2 et CDR3 de xil78F16LC comme indiqué dans SEQ ID N°: 368, 370 et 372, respectivement ;
 - e. une chaîne lourde CDR1, CDR2 et CDR3 de xi237N18HC comme indiqué dans SEQ ID N°: 200, 202 et 204, respectivement, et une chaîne légère CDR1, CDR2 et CDR3 de xi237N18LC comme indiqué dans SEQ ID N°: 374, 376 et

378, respectivement ; ou

- f. chaîne lourde CDR1, CDR2 et CDR3 de xi383118HC comme indiqué dans SEQ ID N°: 206, 208 et 210, respectivement, et une chaîne légère CDR1, CDR2 et CDR3 de xi383118LC comme indiqué dans SEQ ID N°: 380, 382 et 384, respectivement.

12. Immunoglobuline conjuguée comprenant:

l'immunoglobuline selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, dans laquelle la cystéine en position 80 est conjuguée à un composé réactif avec thiol, le composé réactif avec thiol comprenant un groupe réactif avec thiol.

13. Immunoglobuline conjuguée selon la revendication 12, dans laquelle le composé réactif avec thiol comprend en outre un agent fonctionnel, l'agent fonctionnel comprenant un fluorophore, un colorant fluorescent, un polypeptide, une immunoglobuline, un antibiotique, un acide nucléique, un radionucléide, un lieu chimique, une petite molécule, un chélateur, un lipide ou un médicament.

14. Immunoglobuline conjuguée à la mésothéline destinée à être utilisée dans un procédé de traitement du cancer chez un sujet, l'immunoglobuline à mésothéline conjuguée comprenant:

l'immunoglobuline selon la revendication 11(E) ou 11(F), et un composé réactif avec thiol comprenant un groupe réactif avec thiol, un lieu et un agent fonctionnel, dans laquelle l'agent fonctionnel comprend un fluorophore, un colorant fluorescent, un polypeptide, une immunoglobuline, un antibiotique, un acide nucléique, un radionucléide, un lieu chimique, une petite molécule, un chélateur, un lipide ou un médicament.

15. Immunoglobuline de mésothéline conjuguée destinée à être utilisée selon la revendication 14, dans laquelle l'agent fonctionnel est l'auristatine F.

16. Molécule de liaison d'antigène comprenant:

une première immunoglobuline conjuguée comprenant une première région variable de chaîne lourde et une première région variable de chaîne légère, la première région variable de chaîne légère comportant une cystéine en position 80 (« Cys80¹ »), dans laquelle la Cys80¹ est conjuguée à un premier composé réactif avec thiol comprenant un premier groupe réactif au thiol, et dans laquelle l'immunoglobuline est dérivée du lapin et la Cys80¹ est basée sur le système de numérotation de Kabat ou de Chothia, et une seconde immunoglobuline conjuguée comprenant une seconde région variable de chaîne lourde et une seconde région variable de chaîne légère, la seconde région variable de chaîne légère comportant une cystéine en position 80 (« Cys80² ») dans laquelle la Cys80² est conjuguée à un second composé réactif avec thiol comprenant un second groupe réactif avec thiol, et

dans laquelle l'immunoglobuline est dérivée du lapin et la Cys80² est basée sur le système de numérotation de Kabat ou de Chothia.

- 17.** Molécule de liaison d'antigène selon la revendication 16, dans laquelle
- (a) la Cys80¹, la Cys80² ou les deux, ne sont pas appariées, et/ou
 - (b) l'acide aminé en position 83 de la première immunoglobuline, l'acide aminé en position 83 de la seconde immunoglobuline, ou les deux, est un résidu d'acide aminé autre que Phe, Lys ou Cys, dans laquelle la position 83 est basée sur le système de numérotation de Kabat ou de Chothia, et/ou
 - (c) le premier composé réactif avec thiol comprend en outre un premier agent fonctionnel, le second composé réactif avec thiol comprend en outre un second agent fonctionnel, ou les deux, le premier et le second agent fonctionnel comprenant un fluorophore, un colorant fluorescent, un polypeptide, une immunoglobuline, un antibiotique, un acide nucléique, un radionucléide, un lieu chimique, une petite molécule, un chélateur, un lipide ou un médicament, et/ou
 - (d) la première immunoglobuline, la seconde immunoglobuline, ou les deux, sont des Fab.
- 18.** Molécule d'acide nucléique codant l'immunoglobuline selon l'une quelconque des revendications 9 à 11.
- 19.** Cellule hôte comprenant la molécule d'acide nucléique selon la revendication 18.