

## (12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 44670 B1** (51) Cl. internationale : **A61K 39/00; A61P 29/00; C07K 16/32; C07K 16/24; C07K 16/28; A61P 35/00**
- (43) Date de publication : **30.11.2023**

- 
- (21) N° Dépôt : **44670**
- (22) Date de Dépôt : **13.04.2017**
- (30) Données de Priorité : **17.03.2017 EP 17305298**
- (86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT: **PCT/US2017/027488 13.04.2017**
- (71) Demandeur(s) : **SANOFI, 46 avenue de la Grande Armée 75017 Paris (FR)**
- (72) Inventeur(s) : **BEIL, Christian ; BENINGA, Jochen ; LANGE, Christian ; RAO, Ercole ; CORVEY, Carsten ; YANG, Zhi-Yong ; NABEL, Gary, J. ; WEI, Ronnie ; WU, Lan ; SEUNG, Edward ; LEUSCHNER, Wulf Dirk**
- (74) Mandataire : **ATLAS INTELLECTUAL PROPERTY**
- (86) N° de dépôt auprès de l'organisme de validation : EP 17732263.3

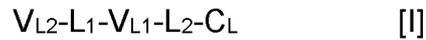
---

(54) Titre : **PROTÉINES DE LIAISON TRISPÉCIFIQUES ET/OU TRIVALENTES**

- (57) Abrégé : L'invention concerne des compositions comprenant des protéines de liaison trispécifiques et/ou trivalentes comprenant quatre chaînes polypeptidiques qui forment trois sites de liaison à l'antigène qui se lient spécifiquement à une ou plusieurs protéines cibles, une première paire de polypeptides qui forme la protéine de liaison possédant des domaines variables doubles ayant une orientation croisée et une seconde paire de polypeptides qui forme la protéine de liaison possédant un domaine variable unique. L'invention concerne également des procédés de production de protéines de liaison trispécifiques et/ou trivalentes et des utilisations de telles protéines de liaison.

## Revendications

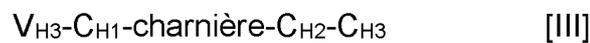
1. Protéine de liaison comprenant quatre chaînes polypeptidiques qui forment trois sites de liaison à un antigène qui se lie spécifiquement à une ou plusieurs protéines cibles, dans laquelle une première chaîne polypeptidique de la protéine de liaison comprend une structure représentée par la formule :



et une deuxième chaîne polypeptidique de la protéine de liaison comprend une structure représentée par la formule :



et une troisième chaîne polypeptidique de la protéine de liaison comprend une structure représentée par la formule :



et une quatrième chaîne polypeptidique de la protéine de liaison comprend une structure représentée par la formule :



dans laquelle :

- $V_{L1}$  est un premier domaine variable de chaîne légère d'immunoglobuline ;
- $V_{L2}$  est un deuxième domaine variable de chaîne légère d'immunoglobuline ;
- $V_{L3}$  est un troisième domaine variable de chaîne légère d'immunoglobuline ;
- $V_{H1}$  est un premier domaine variable de chaîne lourde d'immunoglobuline ;
- $V_{H2}$  est un deuxième domaine variable de chaîne lourde d'immunoglobuline ;
- $V_{H3}$  est un troisième domaine variable de chaîne lourde d'immunoglobuline ;
- $C_L$  est un domaine constant de chaîne légère d'immunoglobuline ;
- $C_{H1}$  est un domaine constant de chaîne lourde  $C_{H1}$  d'immunoglobuline ;
- $C_{H2}$  est un domaine constant de chaîne lourde  $C_{H2}$  d'immunoglobuline ;
- $C_{H3}$  est un domaine constant de chaîne lourde  $C_{H3}$  d'immunoglobuline ;
- la charnière est une région charnière d'immunoglobuline reliant les domaines  $C_{H1}$  et  $C_{H2}$  ; et  $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$  et  $L_4$  sont des liaisons d'acides aminés ;
- et dans laquelle le polypeptide de formule I et le polypeptide de formule II forment une paire chaîne légère-chaîne lourde croisée.

2. Protéine de liaison selon la revendication 1, dans laquelle (a)  $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$  et  $L_4$  ont chacun indépendamment une longueur de zéro acide aminé ou comprennent une séquence choisie dans le groupe constitué par GGGGSGGGGS (SEQ ID N° : 104), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID N° : 105), S, RT, TKGPS (SEQ ID N° : 106), GQPKAAP (SEQ ID N° : 175), et GGSGSSGSGG (SEQ ID N° : 148) ; ou (b)  $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$  et  $L_4$  comprennent chacun indépendamment une séquence choisie dans le groupe constitué par GGGGSGGGGS (SEQ ID N° : 104), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID N° : 105), S, RT, TKGPS (SEQ ID N° : 106), GQPKAAP (SEQ ID N° : 175), et GGSGSSGSGG (SEQ ID N° : 148) ;

N° : 105), S, RT, TKGPS (SEQ ID N° : 106), GQPKAAP (SEQ ID N° : 175), et GSGSSGSGG (SEQ ID N° : 148).

**3. Protéine de liaison selon la revendication 1, dans laquelle**

(a) L<sub>1</sub> comprend la séquence GQPKAAP (SEQ ID N° : 175), L<sub>2</sub> comprend la séquence TKGPS (SEQ ID N° : 106), L<sub>3</sub> comprend la séquence S, et L<sub>4</sub> comprend la séquence RT;

(b) L<sub>1</sub> comprend la séquence GGGGSGGGGS (SEQ ID N° : 104), L<sub>2</sub> comprend la séquence GGGGSGGGGS (SEQ ID N° : 104), L<sub>3</sub> a une longueur de 0 acide aminé et L<sub>4</sub> a une longueur de 0 acide aminé ;

(c) L<sub>1</sub> comprend la séquence GSGSSGSGG (SEQ ID N° : 148), L<sub>2</sub> comprend la séquence GSGSSGSGG (SEQ ID N° : 148), L<sub>3</sub> a une longueur de 0 acide aminé et L<sub>4</sub> a une longueur de 0 acide aminé.

**4. Protéine de liaison selon la revendication 1, dans laquelle la protéine de liaison est trispécifique et capable de se lier spécifiquement à trois cibles antigéniques différentes.**

**5. Protéine de liaison selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans laquelle la protéine de liaison se lie spécifiquement à trois protéines cibles qui correspondent à deux protéines cibles sur les lymphocytes T et à une protéine cible de la tumeur ; dans laquelle, facultativement, l'une desdites protéines cibles sur les lymphocytes T est CD3, l'une desdites protéines cibles sur les lymphocytes T est CD28, et/ou ladite protéine cible de la tumeur est CD38.**

**6. Protéine de liaison selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans laquelle la protéine de liaison se lie spécifiquement à trois protéines cibles qui correspondent à deux protéines cibles sur les lymphocytes T et à une protéine cible choisie dans le groupe constitué par A2AR, APRIL, ATPDase, BAFF, BAFFR, BCMA, BlyS, BTK, BTLA, B7DC, B7H1, B7H4, B7H5, B7H6, B7H7, B7RP1, B7-4, C3, C5, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL15, CCL17, CCL19, CCL20, CCL21, CCL24, CCL25, CCL26, CCR3, CCR4, CD3, CD19, CD20, CD23, CD24, CD27, CD28, CD38, CD39, CD40, CD70, CD80, CD86, CD122, CD137, CD137L, CD152, CD154, CD160, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD278, CD279, CDH1, chitinase, CLEC9, CLEC91, CRTH2, CSF-1, CSF-2, CSF-3, CX3CL1, CXCL12, CXCL13, CXCR3, DNGR-1, ectonucléoside triphosphate diphosphohydrolase 1, EGFR, ENTPD1, FCER1A, FCER1, FLAP, FOLH1, Gi24, GITR, GITRL, GM-CSF, Her2, HHLA2, HMGB1, HVEM, ICOSLG,IDO, IFN $\alpha$ , IgE, IGF1R, IL2Rbeta, IL1, IL1A, IL1B, IL1F10, IL2, IL4, IL4Ra, IL5, IL5R, IL6, IL7, IL7Ra, IL8, IL9, IL9R, IL10, rhIL10, IL12, IL13, IL13Ra1, IL13Ra2, IL15, IL17, IL17Rb, IL18, IL22, IL23, IL25, IL27, IL33, IL35, ITGB4, ITK, KIR, LAG3, LAMP1, leptine, LPFS2, CMH classe II, NCR3LG1, NKG2D, NTPDase-1, OX40, OX40L, PD-1H, récepteur plaquettaire, PROM1, S152, SISP1, SLC, SPG64, ST2, STEAP2, Syk kinase, TACI, TDO, T14, TIGIT, TIM3, TLR, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, TMEF1, TNF $\alpha$ , TNFRSF7, Tp55, TREM1, TSLP, TSLPR, TWEAK, VEGF, VISTA, Vstm3, WUCAM et XCR1.**

**7. Protéine de liaison selon la revendication 5 ou la revendication 6, dans laquelle L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, et/ou L<sub>4</sub> comprennent la séquence Asp-Lys-Thr-His-Thr (SEQ ID N° : 525).**

- 8.** Protéine de liaison selon la revendication 1 ou la revendication 5, dans laquelle
- $V_{H1}$  comprend une CDR-H1 comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 28, une CDR-H2 comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 29, et une CDR-H3 comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 30 ;
  - $V_{L1}$  comprend une CDR-L1 comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 46, une CDR-L2 comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 47, et une CDR-L3 comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 48 ; et
  - $V_{H2}$  comprend une CDR-H1 comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 34, une CDR-H2 comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 35, et une CDR-H3 comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 36 ;
  - $V_{L2}$  comprend une CDR-L1 comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 52, une CDR-L2 comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 53, et une CDR-L3 comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 54.
- 9.** Protéine de liaison selon la revendication 1, dans laquelle  $V_{H1}$  et  $V_{L1}$  forment un premier site de liaison à l'antigène qui se lie spécifiquement au CD28 humain, dans laquelle  $V_{H2}$  et  $V_{L2}$  forment un deuxième site de liaison à l'antigène qui se lie spécifiquement au CD3 humain, et dans laquelle  $V_{H3}$  et  $V_{L3}$  forment un troisième site de liaison à l'antigène qui se lie spécifiquement à une protéine cible tumorale humaine.
- 10.** Protéine de liaison selon la revendication 9, dans laquelle le troisième site de liaison à l'antigène se lie spécifiquement à une protéine cible tumorale humaine choisie dans le groupe constitué par CD19, CD20, CD38, Her2 et LAMP1.
- 11.** Protéine de liaison selon la revendication 9 ou 10, dans laquelle le site de liaison à l'antigène qui se lie spécifiquement au CD3 comprend :
- (a) un domaine variable de chaîne lourde comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 152 et un domaine variable de chaîne légère comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 153 ; ou
  - (b) un domaine variable de chaîne lourde comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 154 et un domaine variable de chaîne légère comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 155.
- 12.** Protéine de liaison selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, dans laquelle le site de liaison à l'antigène qui se lie spécifiquement au CD28 comprend :
- (a) un domaine variable de chaîne lourde comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 160 et un domaine variable de chaîne légère comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 161 ; ou
  - (b) un domaine variable de chaîne lourde comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 162 et un domaine variable de chaîne légère comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 163.

**13.** Protéine de liaison selon l'une quelconque des revendications 9 à 12, dans laquelle le site de liaison à l'antigène qui se lie spécifiquement à une protéine cible de la tumeur comprend :

- (a) un domaine variable de chaîne lourde comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 156 et un domaine variable de chaîne légère comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 157 ;
- (b) un domaine variable de chaîne lourde comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 158 et un domaine variable de chaîne légère comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 159 ;
- (c) un domaine variable de chaîne lourde comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 164 et un domaine variable de chaîne légère comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 165 ;
- (d) un domaine variable de chaîne lourde comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 150 et un domaine variable de chaîne légère comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 151 ; ou
- (e) un domaine variable de chaîne lourde comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 166 et un domaine variable de chaîne légère comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID N° : 167.

**14.** Molécule d'acide nucléique isolée comprenant une séquence nucléotidique codant pour la protéine de liaison selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

**15.** Vecteur d'expression comprenant la molécule d'acide nucléique selon la revendication 14.

**16.** Cellule hôte isolée comprenant la molécule d'acide nucléique selon la revendication 14, ou le vecteur d'expression selon la revendication 15, dans laquelle facultativement la cellule hôte est une cellule de mammifère ou une cellule d'insecte.

**17.** Composition pharmaceutique comprenant la protéine de liaison selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, et un support pharmaceutiquement acceptable.

**18.** Protéine de liaison selon l'une quelconque des revendications 5 à 13 ou composition selon la revendication 17 pour une utilisation dans la prévention et/ou le traitement du cancer chez un patient.

**19.** Protéine de liaison pour une utilisation ou composition pour une utilisation selon la revendication 18, dans laquelle la protéine de liaison comprend un site de liaison à l'antigène qui se lie spécifiquement à une protéine de surface des lymphocytes T et un autre site de liaison à l'antigène qui se lie spécifiquement à une protéine cible de la tumeur.

**20.** Protéine de liaison pour une utilisation ou composition pour une utilisation selon la revendication 19, dans laquelle la protéine de liaison comprend un premier site de liaison à l'antigène qui se lie spécifiquement à CD3, un deuxième site de liaison à l'antigène qui se lie spécifiquement à CD28, et un troisième site de liaison à l'antigène

qui se lie spécifiquement à une protéine cible tumorale choisie dans le groupe constitué par CD19, CD20, CD38, Her2, et LAMP1.

**21.** Protéine de liaison pour une utilisation ou composition pour une utilisation selon l'une quelconque des revendications 18 à 20, dans laquelle la protéine de liaison est administrée en même temps qu'un agent chimiothérapeutique.

**22.** Protéine de liaison selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 ou composition pharmaceutique selon la revendication 17 pour une utilisation dans la prévention et/ou le traitement d'une maladie ou d'un trouble inflammatoire chez un patient.

**23.** Protéine de liaison pour une utilisation ou composition pour une utilisation selon la revendication 22, dans laquelle la protéine de liaison comprend trois sites de liaison à l'antigène qui se lient chacun spécifiquement à une protéine cible de cytokine choisie dans le groupe constitué par IL-4, IL-13 et TNF $\alpha$ .

**24.** Protéine de liaison pour une utilisation ou composition pour une utilisation selon la revendication 22 ou la revendication 23, dans laquelle la protéine de liaison est administrée en même temps qu'un agent anti-inflammatoire.

**25.** Protéine de liaison pour une utilisation ou composition pour une utilisation selon l'une quelconque des revendications 18 à 24, dans laquelle le patient est un être humain.

**26.** Protéine de liaison pour une utilisation ou composition pour une utilisation selon la revendication 18 ou de la revendication 22, dans laquelle la protéine de liaison est capable d'inhiber la fonction d'une ou de plusieurs protéines cibles choisies dans le groupe constitué par A2AR, APRIL, ATPDase, BAFF, BAFFR, BCMA, BlyS, BTK, BTLA, B7DC, B7H1, B7H4, B7H5, B7H6, B7H7, B7RP1, B7-4, C3, C5, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL15, CCL17, CCL19, CCL20, CCL21, CCL24, CCL25, CCL26, CCR3, CCR4, CD3, CD19, CD20, CD23, CD24, CD27, CD28, CD38, CD39, CD40, CD70, CD80, CD86, CD122, CD137, CD137L, CD152, CD154, CD160, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD278, CD279, CDH1, chitinase, CLEC9, CLEC91, CRTH2, CSF-1, CSF-2, CSF-3, CX3CL1, CXCL12, CXCL13, CXCR3, DNGR-1, ectonucléoside triphosphate diphosphohydrolase 1, EGFR, ENTPD1, FCER1A, FCER1, FLAP, FOLH1, Gi24, GITR, GITRL, GM-CSF, Her2, HHLA2, HMGB1, HVEM, ICOSLG,IDO, IFN $\alpha$ , IgE, IGF1R, IL2Rbeta, IL1, IL1A, IL1B, IL1F10, IL2, IL4, IL4Ra, IL5, IL5R, IL6, IL7, IL7Ra, IL8, IL9, IL9R, IL10, rhIL10, IL12, IL13, IL13Ra1, IL13Ra2, IL15, IL17, IL17Rb, IL18, IL22, IL23, IL25, IL27, IL33, IL35, ITGB4, ITK, KIR, LAG3, LAMP1, leptine, LPFS2, CMH classe II, NCR3LG1, NKG2D, NTPDase-1, OX40, OX40L, PD-1H, récepteur plaquettaire, PROM1, S152, SISP1, SLC, SPG64, ST2, STEAP2, Syk kinase, TACI, TDO, T14, TIGIT, TIM3, TLR, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, TMEF1, TNF $\alpha$ , TNFRSF7, Tp55, TREM1, TSLP, TSLPR, TWEAK, VEGF, VISTA, Vstm3, WUCAM et XCR1.