

(12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 49513 B1**
- (43) Date de publication : **31.05.2024**
- (51) Cl. internationale : **A61K 35/76; A61K 48/00; C07K 14/015; C12N 5/10; C07K 16/28; C12N 15/35; C12N 15/864; C07K 16/18**

-
- (21) N° Dépôt : **49513**
- (22) Date de Dépôt : **27.06.2018**
- (30) Données de Priorité : **27.06.2017 US 201762525704 P**
- (86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT: **PCT/US2018/039874 27.06.2018**
- (71) Demandeur(s) : **Regeneron Pharmaceuticals, Inc., 777 Old Saw Mill River Road Tarrytown, NY 10591 (US)**
- (72) Inventeur(s) : **MURPHY, Andrew J. ; KYRATSOUS, Christos ; SABIN, Leah ; WANG, Cheng**
- (74) Mandataire : **CABINET DIANI**

-
- (54) Titre : **VECTEURS VIRAUX RECOMBINANTS AU TROPISME MODIFIÉ ET LEURS UTILISATIONS POUR L'INTRODUCTION CIBLÉE DE MATÉRIEL GÉNÉTIQUE DANS DES CELLULES HUMAINES**
- (57) Abrégé : L'invention concerne des compositions et des procédés de reciblage de protéines de capsid/capsides/vecteurs viraux recombinés, par exemple, in vivo, avec une molécule de liaison multispécifique, telle qu'un anticorps bispécifique, qui se lie spécifiquement à un épitope hétérologue présenté par la protéine de capsid et à une protéine exprimée sur la cellule d'intérêt pour l'administration ciblée d'un nucléotide d'intérêt.

REVENDEICATIONS

1. Composition comprenant

(i) un vecteur de virus adéno-associé (AAV) recombinant comprenant

une capsid AAV qui encapsule un nucléotide d'intérêt,

dans laquelle la capsid AAV comprend une protéine de capsid AAV recombinante modifiée pour comprendre un épitope hétérologue, dans laquelle la protéine de capsid AAV recombinante est dérivée d'un gène de capsid AAV modifié pour exprimer l'épitope hétérologue ;

(ii) une molécule de liaison multispécifique comprenant

(a) un paratope d'anticorps qui se lie spécifiquement à l'épitope hétérologue ; et

(b) un ligand de ciblage qui se lie spécifiquement à une protéine ou un marqueur de surface cellulaire ; et éventuellement

(iii) un support pharmaceutiquement acceptable,

dans laquelle la capsid AAV présente :

- un tropisme réduit à aboli en l'absence de la molécule de liaison multispécifique ; et

- un tropisme modifié, lors d'une combinaison avec la molécule de liaison multispécifique, en comparaison avec une capsid AAV de référence, dans laquelle la capsid AAV de référence comprend une protéine de capsid AAV de référence qui est identique à la protéine de capsid AAV recombinante, à l'exception de l'absence de l'épitope hétérologue.

2. Composition selon la revendication 1, dans laquelle la protéine de capsid AAV recombinante comprend en outre une mutation en plus de l'épitope hétérologue.

3. Composition selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle l'épitope hétérologue est inséré de telle sorte que l'insertion réduit partiellement le tropisme de la capsid AAV en comparaison avec une capsid AAV de référence dépourvue de l'épitope hétérologue et la protéine de capsid AAV comprend en outre une mutation (par exemple, une substitution, une délétion, une insertion autre que l'insertion de l'épitope hétérologue), en plus de l'insertion de l'épitope hétérologue, la mutation réduisant davantage et/ou abolissant le tropisme de la capsid AAV recombinante en comparaison avec une capsid AAV de référence dépourvue de la mutation.

4. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans laquelle le tropisme modifié lors d'une combinaison avec la molécule de liaison multispécifique signifie que le tropisme de la capsid AAV est restauré et réorienté en comparaison avec le tropisme de la capsid AAV de référence.

5. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle
- (i) l'épitope hétérologue comprend une étiquette d'affinité et un lieu éventuel, et/ou
 - (ii) la protéine de capsid AAV recombinante comprend une séquence d'acides aminés EQKLISEEDL (présentée comme SEQ ID N° : 6) flanquée par au moins 5 acides aminés contigus d'une protéine de capsid AAV et/ou liée fonctionnellement à ceux-ci.
6. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle l'épitope hétérologue comprend une séquence d'acides aminés EQKLISEEDL (SEQ ID N° : 6) ou une portion de celle-ci, et dans laquelle le paratope d'anticorps se lie spécifiquement à la séquence d'acides aminés EQKLISEEDL ou à une portion de celle-ci.
7. Composition selon la revendication 1, dans laquelle le nucléotide d'intérêt est :
- (i) sous la commande d'un promoteur sélectionné dans le groupe constitué d'un promoteur viral, d'un promoteur bactérien, d'un promoteur mammifère, d'un promoteur aviaire, d'un promoteur de poisson, d'un promoteur d'insecte, et de toute combinaison de ceux-ci ; éventuellement dans laquelle le nucléotide d'intérêt est sous la commande d'un promoteur non humain ; ou
 - (ii) sous la commande d'un promoteur non humain et flanqué par des séquences ITR d'AAV ; ou
 - (iii) un gène rapporteur, éventuellement dans laquelle le gène rapporteur code pour la protéine fluorescente verte, ou est sélectionné dans le groupe constitué d'un gène suicide, d'un nucléotide codant pour un anticorps ou un fragment de celui-ci, d'un nucléotide codant pour un système CRISPR/Cas ou une(des) portion(s) de celui-ci, d'un nucléotide codant pour un ARN antisens, d'un nucléotide codant pour un ARNsi, et d'une combinaison de ceux-ci.
8. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle la molécule de liaison multispécifique est une molécule de liaison bispécifique.
9. Composition selon la revendication 1, dans laquelle le paratope d'anticorps est un domaine Fv, éventuellement dans laquelle le domaine Fv est directement fusionné à un domaine constant de chaîne lourde.
10. Composition selon la revendication 1, dans laquelle le ligand de ciblage est un anticorps ou une portion de celui-ci, éventuellement :
- dans laquelle l'anticorps est un anticorps bispécifique, dans lequel le paratope d'anticorps et le ligand de ciblage comprennent chacun un domaine Fv distinct fusionné à un premier et un deuxième domaine constant de chaîne lourde, éventuellement dans laquelle les première et deuxième chaînes lourdes se lient à la protéine A avec des affinités de liaison différentielles ou

dans laquelle le ligand de reciblage comprend une structure d'anticorps tétramère comprenant deux chaînes lourdes d'immunoglobuline identiques et deux chaînes légères identiques et dans laquelle le paratope d'anticorps qui se lie à l'épitope hétérologue est annexé à l'extrémité C-terminale ou à l'extrémité N-terminale de l'une ou des deux chaînes lourdes et/ou à l'extrémité C-terminale ou à l'extrémité N-terminale de l'une ou des deux chaînes lourdes, et éventuellement dans laquelle le paratope d'anticorps est un scFv, éventuellement dans laquelle le scFv comprend une séquence d'acides aminés présentée comme SEQ ID N° : 37.

11. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle la protéine de surface cellulaire est un récepteur ; et/ou dans laquelle le ligand de reciblage se lie à un récepteur exprimé sur la surface d'une cellule mammifère ou humaine.

12. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle l'AAV est sélectionné dans le groupe constitué de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 et AAV9 et/ou dans laquelle l'épitope hétérologue est inséré après et/ou remplace une position sélectionnée dans le groupe constitué de I-453 de AAV2, I-587 de AAV2, I-585 de AAV6, I-590 de AAV8, I-453 de AAV9, I-589 de AAV9, et tout acide aminé correspondant d'un sérotype d'AAV qui infecte les primates.

13. Composition selon l'une des revendications précédentes, dans laquelle la capsid AAV est une capsid mosaïque qui comprend une protéine de capsid AAV de référence du même sérotype qui ne comprend pas l'épitope hétérologue dans un certain rapport.

14. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle la protéine de capsid AAV recombinante est dérivée d'un gène de capsid AAV chimérique modifié pour exprimer l'épitope hétérologue, dans laquelle le gène de capsid AAV chimérique comprend une pluralité de séquences d'acides nucléiques, dans laquelle chacune de la pluralité de séquences d'acides nucléiques code pour une portion d'une protéine de capsid d'un sérotype AAV différent, et dans laquelle la pluralité de séquences d'acides nucléiques code ensemble pour une protéine de capsid AAV chimérique.

15. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes pour une utilisation dans un procédé de traitement ou de diagnostic *in vivo*, le procédé comprenant l'administration du nucléotide d'intérêt à une cellule cible exprimant une protéine de surface cellulaire comprenant la mise en contact de la cellule cible avec la composition, dans laquelle la molécule de liaison multispécifique comprend un ligand de reciblage qui se lie à la protéine de surface cellulaire.

16. Composition pour une utilisation selon la revendication 15, dans laquelle :

- (a) l'administration se fait à un sujet humain ; ou
- (b) la cellule cible est une cellule humaine ; ou

- (c) la cellule cible est une cellule neuronale humaine ; ou
- (d) la cellule cible est une cellule musculaire humaine ; ou
- (e) la cellule cible est sélectionnée dans le groupe constitué d'une cellule hépatique, d'une cellule cérébrale, d'une cellule T, d'une cellule rénale, d'une cellule intestinale, d'une cellule pancréatique, d'une cellule cancéreuse, et d'une cellule infectée par un agent pathogène hétérologue.

17. Composition pour une utilisation selon la revendication 15 ou la revendication 16 dans laquelle :

- (a) la cellule cible est une cellule hépatique humaine, éventuellement dans laquelle le ligand de reciblage se lie au récepteur 1 d'asialoglycoprotéine humaine (hASGR1) exprimé par la cellule hépatique humaine ; ou
- (b) le ligand de reciblage se lie au récepteur GABA exprimé par la cellule neuronale humaine ; ou
- (c) le ligand de reciblage se lie au récepteur transferrine exprimé par la cellule neuronale humaine ;
- (d) la cellule cible est une cellule T humaine, éventuellement dans laquelle le ligand de reciblage se lie au CD3 exprimé par la cellule T humaine ; ou
- (e) la cellule cible est une cellule T humaine, éventuellement dans laquelle le ligand de reciblage se lie au CD3ε exprimé par la cellule T humaine ; ou
- (f) la cellule cible est une cellule hématopoïétique humaine, éventuellement dans laquelle le ligand de reciblage se lie au CD34 ; ou
- (g) la cellule cible est une cellule cancéreuse humaine, éventuellement dans laquelle le ligand de reciblage se lie à un antigène associé à une tumeur ; ou
- (h) la cellule cible est une cellule cancéreuse humaine, éventuellement dans laquelle le ligand de reciblage se lie à un antigène associé à une tumeur qui est E6, E7 ou Her2 ; ou
- (i) la protéine de surface cellulaire est un récepteur de glucagon humain (hGCGR) ; ou
- (j) la cellule cible est une cellule intestinale ou une cellule pancréatique ; éventuellement dans laquelle le récepteur est ENTPD3.

18. Composition pour une utilisation dans le procédé de la revendication 15 ou 16, dans laquelle :

- (i) le ligand de reciblage se lie au CD20 ; ou
- (ii) le ligand de reciblage se lie au récepteur glucagon humain ; ou
- (iii) le ligand de reciblage se lie spécifiquement au CD63 ou à l'ectonucléoside triphosphate diphosphohydrolase 3 humaine (hENTPD3).

19. Composition selon la revendication 5(i) dans laquelle l'étiquette d'affinité comprend c-myc (EQKLISEEDL ; SEQ ID N° : 6).

20. Composition selon la revendication 6 dans laquelle le paratope d'anticorps se lie spécifiquement à c-myc, lequel paratope d'anticorps comprend une séquence HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 et/ou LCDR3 du scFv codé par la séquence d'acide nucléique présentée comme SEQ ID N° : 28.

21. Procédé *in vitro* ou *ex vivo* pour administrer un nucléotide d'intérêt à une cellule cible exprimant une protéine de surface cellulaire comprenant la mise en contact de la cellule cible avec la composition de l'une quelconque des revendications 1 à 14, dans lequel la molécule de liaison multispécifique comprend un ligand de reciblage qui se lie à la protéine de surface cellulaire.