

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤④ conjugués anticorps-médicament anti-CD56 et leur utilisation en thérapie.

②② Date de dépôt : 27.02.20.

③③ Priorité :

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : *Mc SAF Société par actions
simplifiée —FR, UNIVERSITE DE TOURS
Etablissement public à caractère scientifique, culturel
et professionnel FR et CENTRE HOSPITALIER
REGIONAL UNIVERSITAIRE DE TOURS
Etablissement d'hospitalisation — FR.*

④③ Date de mise à la disposition du public
de la demande : 03.09.21 Bulletin 21/35.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 18.03.22 Bulletin 22/11.

⑦② Inventeur(s) : JUEN Ludovic, BALTUS Christine,
DESGRANGES Audrey, TOUZÉ Antoine,
KERVARREC Thibault, LEBLOND Valérie et SAMIMI
Mahtab.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

⑦③ Titulaire(s) : *Mc SAF Société par actions simplifiée.*

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑦④ Mandataire(s) : CABINET BEAU DE LOMENIE.



Description

Titre de l'invention : conjugués anticorps-médicament anti-CD56 et leur utilisation en thérapie

Domaine technique

[0001] La présente invention concerne des nouveaux conjugués anticorps-médicaments comprenant un anticorps dirigé contre l'antigène CD56 couplé à un médicament cytotoxique et leur utilisation comme médicament, notamment en thérapie anticancéreuse.

Technique antérieure

[0002] Un conjugué anticorps-médicament (en anglais « Antibody Drug Conjugate » ou « ADC ») constitue un moyen de délivrance sélective d'un médicament cytotoxique. Le conjugué anticorps-médicament permet donc de combiner la spécificité du ciblage par les anticorps avec de nouvelles fonctions effectrices puissantes par les agents qui leur sont conjugués.

[0003] La structure générale d'un conjugué anticorps-médicament est celle de la formule (I). La partie liant l'anticorps et le médicament est appelée bras de liaison ou linker. Il peut être greffé sur l'anticorps via l'une au moins des huit cystéines formant les 4 ponts disulfures inter-chaînes. Le nombre de molécules de médicaments cytotoxiques greffées sur l'anticorps détermine un ratio appelé Drug-to-Antibody Ratio (DAR).

[0004] Après fixation sur son antigène cible, l'anticorps est internalisé dans la cellule par endocytose médiée par des récepteurs. Les vésicules fusionnent avec des lysosomes où le médicament cytotoxique est libéré de l'anticorps via différents mécanismes. Le médicament cytotoxique actif agit ensuite sur la cellule en induisant sa mort et parfois sur les cellules cancéreuses voisines par transport ou diffusion dans l'environnement. L'anticorps est donc principalement utilisé comme vecteur et apporte le médicament cytotoxique dans la cellule ciblée.

[0005] Le carcinome à cellules de Merkel (CCM) est un cancer cutané agressif survenant chez le sujet âgé. Jusqu'à récemment, le traitement des patients métastatiques inopérables reposait sur une poly-chimiothérapie à base de sels de platine, sans bénéfice sur la survie. L'utilisation d'une immunothérapie ciblant le PD-L1 (avelumab) en première ligne permet d'obtenir une réponse objective chez environ 50% des patients avec un CCM inopérable avec une réponse durable observée chez la moitié des patients répondeurs. Cependant, la persistance de patients non répondeurs incite à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans ce contexte, le développement d'une thérapie ciblée dans le CCM semble constituer une stratégie prometteuse.

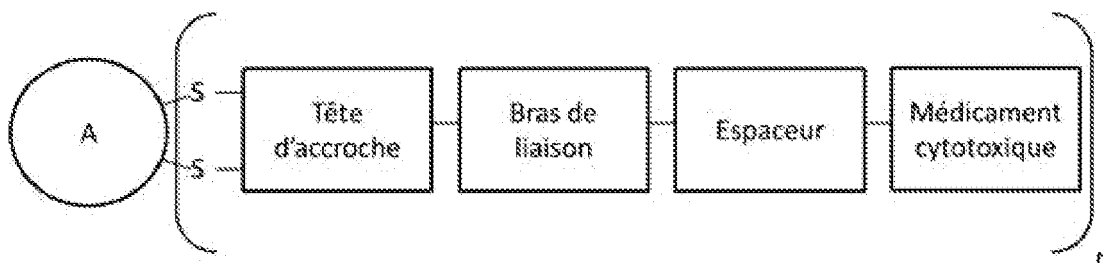
[0006] Dans ce contexte, le CD56 a été identifié comme une cible thérapeutique fortement

exprimée par la majorité des CCM. En effet, le IMG901 qui est un ADC anti-CD56 couplé à la mertansine (DM1) par une technologie de première génération, inhibe la polymérisation de la tubuline. Une tolérance acceptable de l'IMG901 a pu être démontrée par plusieurs études de phase I chez les patients avec tumeurs solides exprimant le CD56 dont des cas de CCM. De plus, une étude de phase II a été proposée avec la même molécule dans le carcinome à petites cellules du poumon, en combinaison avec la chimiothérapie (cisplatine étoposide). Cette étude n'a pas montré de bénéfice sur la survie du fait de la survenue fréquente d'effets secondaires dans le groupe traité par IMG901 et notamment de neutropénie fébrile (infection liée à une diminution des neutrophiles) suggérant une toxicité non spécifique du produit. Il existe donc un besoin de développer des conjugués anti-CD56-médicament cytotoxiques plus homogènes, plus stables et donc plus efficaces et/ou qui génèrent moins d'effets secondaires. De plus, la technologie décrite dans le présent brevet permet de délivrer spécifiquement la molécule cytotoxique aux cellules tumorales tout en limitant son relargage non spécifique dans la circulation limitant de ce fait les toxicités non spécifiques induites par la drogue.

Résumé de l'invention

[0007] Un premier objet de l'invention concerne un conjugué anticorps-médicament de formule (I) suivante :

[Chem. 1]

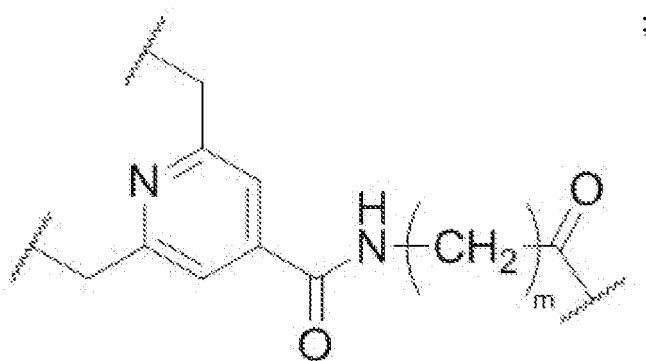


dans laquelle :

A est un anticorps ou un fragment d'anticorps anti-CD56 ;

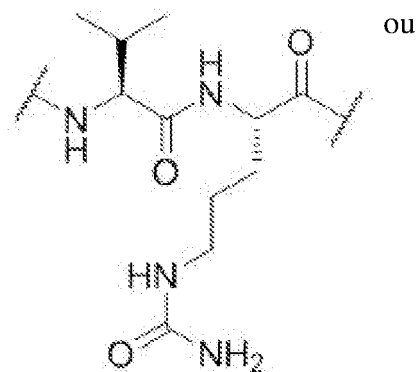
la tête d'accroche est représentée par la formule suivante :

[Chem. 2]

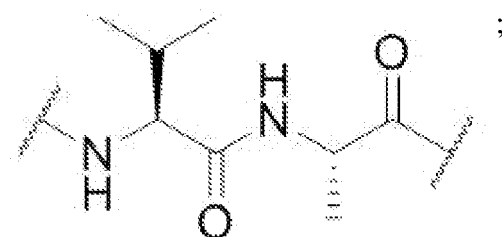


le bras de liaison est un bras de liaison clivable choisi parmi les formules suivantes :

[Chem. 3]

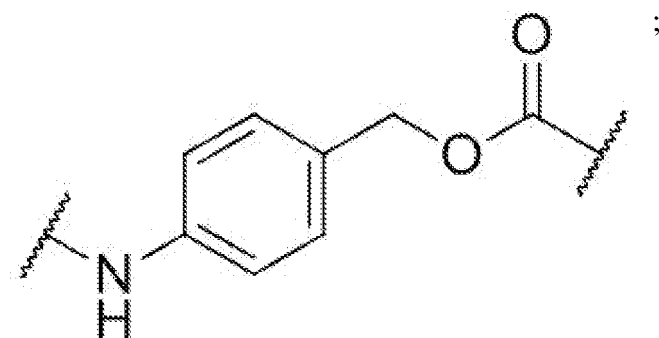


[Chem. 4]



l'espaceur est représenté par la formule suivante :

[Chem. 5]



m est un entier allant de 1 à 10 ;

n est un entier allant de 1 à 4.

[0008] Un second objet de l'invention concerne une composition comprenant un ou plusieurs conjugué(s) anticorps-médicament selon l'invention.

[0009] Un troisième objet de l'invention concerne un conjugué anticorps-médicament selon l'invention ou une composition selon l'invention, pour utilisation comme médicament.

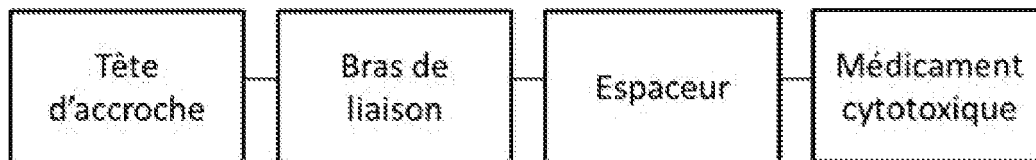
[0010] Un quatrième objet de l'invention concerne un conjugué anticorps-médicament selon l'invention ou une composition selon l'invention, pour utilisation dans le traitement d'un cancer CD56+.

Description détaillée

[0011] Définitions

[0012] Le terme « conjugué cytotoxique » désigne un conjugué qui comprend un médicament cytotoxique. Dans le cadre de la présente invention, un conjugué cytotoxique désigne un conjugué de formule (II) suivante :

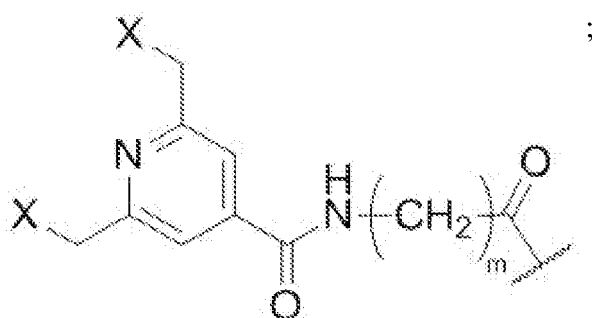
[Chem. 6]



dans laquelle :

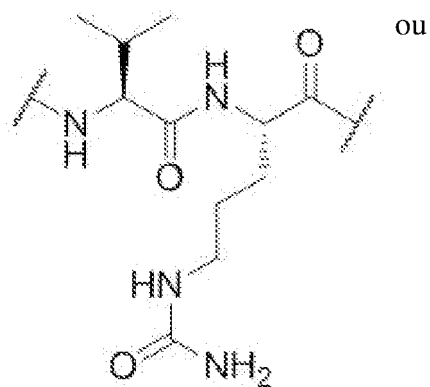
la tête d'accroche est représentée par la formule suivante :

[Chem. 7]



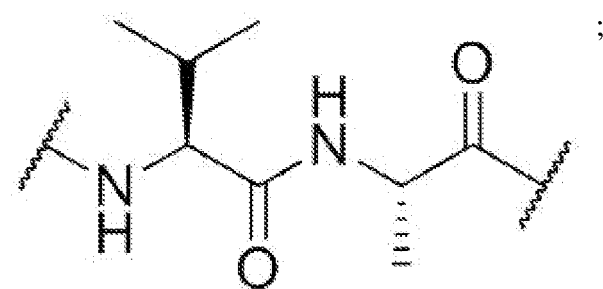
le bras de liaison est un bras de liaison clivable choisi parmi les formules suivantes :

[Chem. 3]



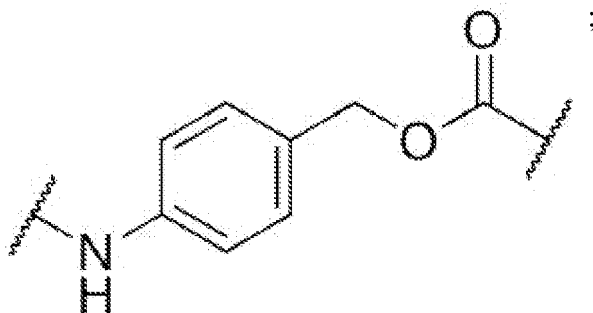
ou

[Chem. 4]



l'espaceur est représenté par la formule suivante :

[Chem. 5]



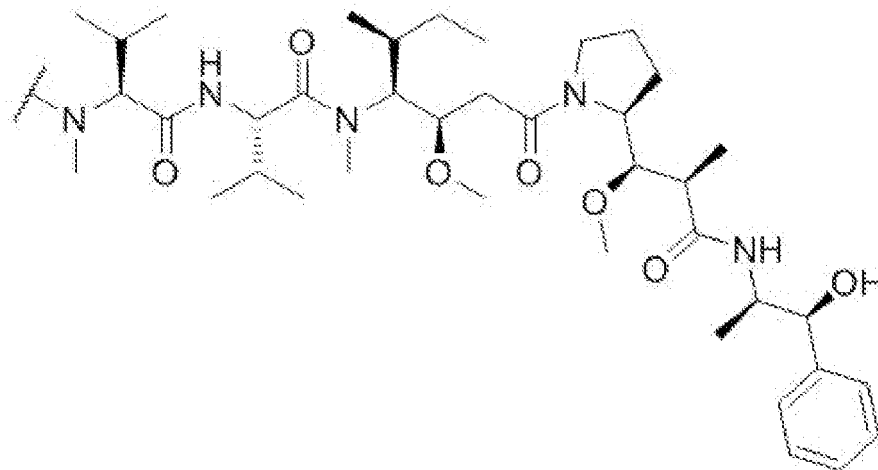
X est Br, Cl, I ou F ;

m est un entier allant de 1 à 10.

- [0013] Le terme « médicament cytotoxique » désigne toute molécule naturelle ou de synthèse, capable d'inhiber ou d'empêcher la fonction et/ou le développement des cellules. On entend par « cytotoxique », la propriété pour un agent chimique ou biologique, d'altérer des cellules, éventuellement jusqu'à les détruire.
- [0014] Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le médicament cytotoxique est choisi parmi tout composé ayant obtenu une AMM et qui est utilisé en thérapie anti-cancéreuse ou anti-inflammatoire, toute molécule en cours d'évaluation clinique en thérapie anti-cancéreuse ou anti-inflammatoire. Le médicament cytotoxique sera choisi par exemple parmi le paclitaxel (Taxol®) ou le docetaxel (Taxotère®) ou l'un de ses dérivés, le topotecan, le bortezomib, la daunorubicine, les analogues de daunorubicine, la vincristine, la mitomycine C, l'acide rétinoïque, le méthotrexate, l'ilomédine, l'aspirine, un IMIDs, le lénalidomide, le pomalidomide.
- [0015] Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, le médicament cytotoxique est sélectionné dans le groupe constitué de la duocarmycine et ses analogues, les dolastatines, la combretastatine et ses analogues, la calichéamicine, la N-acétyl-γ-calichéamicine (CMC), un dérivé de calichéamicine, la maytansine et ses analogues, tel qu'un dérivé de type maytansinoïde, par exemple le DM1 et le DM4, les auristatines et leurs dérivés, tels que l'auristatine E, l'auristatine EB (AEB), l'auristatine EFP (AEFP), la monométhyle auristatine E (MMAE), la monométhyle auristatine F (MMAF), la tubulysine, le disorazole, les epothilones, l'echinomycine, l'estramustine, la cemadotine, l'eleutherobine, la méthoptérine, l'actinomycine, la mitomycine A, la camptothécine, un dérivé de la camptothécine, le SN38, le TK1, l'amanitine, une pyrrolobenzodiazépine, un dimère de pyrrolobenzodiazépine, une pyrrolopyridodiazépine, un dimère de pyrrolopyridodiazépine, un intercalant de l'ADN, un inhibiteur d'histone désacétylase, ou un inhibiteur de tyrosine kinase. Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, le médicament M est sélectionné parmi l'exotoxine de pseudomonas (PE), la deBouganin, la Bouganin, la toxine diphtérique (DT) et la ricine.
- [0016] Dans un mode de réalisation particulier, le médicament cytotoxique est choisi parmi méthotrexate, IMIDs, duocarmycin, combretastatine, calichéamicine, monométhyle au-

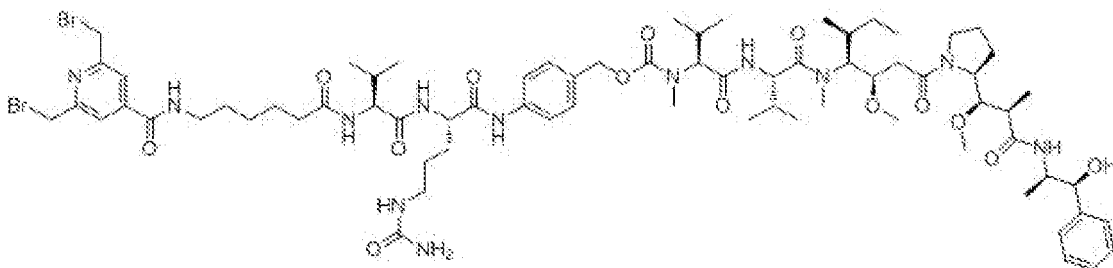
ristatine E (MMAE), monométhyle auristatine F (MMAF), maytansine, DM1, DM4, SN38, amanitine, pyrrolobenzodiazépine, dimère de pyrrolobenzodiazépine, pyrrolopyridodiazépine, dimère de pyrrolopyridodiazépine, un inhibiteur de l'histone désacétylase, un inhibiteur de tyrosine kinase, et ricine, de préférence MMAE, représentée par la formule suivante :

[Chem. 8]



[0017] Ainsi, dans un mode de réalisation particulièrement préféré de l'invention, le conjugué cytotoxique répond à la formule (IIa) suivante :

[Chem. 9]



[0018] Le terme « anticorps », également appelé « immunoglobuline » désigne un hétérotétramère constitué de deux chaînes lourdes d'environ 50-70 kDa chacune (dites les chaînes H pour Heavy) et de deux chaînes légères d'environ 25 kDa chacune (dites les chaînes L pour Light), liées entre elles par des ponts disulfures intra et intercaténaux. Chaque chaîne est constituée, en position N-terminale, d'une région ou domaine variable, dit VL pour la chaîne légère, VH pour la chaîne lourde, et en position C-terminale, d'une région constante, constitué d'un seul domaine dit CL pour la chaîne légère et de trois ou quatre domaines nommés CH1, CH2, CH3, CH4, pour la chaîne lourde.

[0019] Par « anticorps chimérique », on entend un anticorps dont les séquences des régions variables des chaînes légères et des chaînes lourdes appartiennent à une espèce différente de celle des séquences de régions constantes des chaînes légères et des

chaînes lourdes. Aux fins de l'invention, les séquences des régions variables des chaînes lourdes et légères sont préférentiellement d'origine murine tandis que les séquences des régions constantes des chaînes lourdes et légères appartiennent à une espèce non-murine. A cet égard, pour les régions constantes, toutes les espèces de mammifères non-murins sont susceptibles d'être utilisées, et en particulier l'homme, le singe, les suidés, les bovidés, les équidés, les félidés, les canidés ou encore les oiseaux, cette liste n'étant pas exhaustive. De façon préférée, les anticorps chimériques selon l'invention contiennent des séquences de régions constantes des chaînes lourdes et légères d'origine humaine et les séquences de régions variables des chaînes lourdes et légères d'origine murine.

[0020] Par « anticorps humanisé », on entend un anticorps dont tout ou partie des séquences des régions impliquées dans la reconnaissance de l'antigène (les régions hypervariables ou CDR : Complementarity Determining Région) et parfois certains acides aminés des régions FR (régions Framework) sont d'origine non-humaine tandis que les séquences des régions constantes et des régions variables non-impliquées dans la reconnaissance de l'antigène sont d'origine humaine.

[0021] Par « anticorps humain », on entend un anticorps contenant uniquement des séquences humaines, aussi bien pour les régions variables et constantes des chaînes légères que pour les régions variables et constantes des chaînes lourdes.

[0022] On entend par « fragment d'anticorps », toute partie d'une immunoglobuline obtenue par digestion enzymatique ou obtenue par bioproduction comprenant au moins un pont disulfure, par exemple Fab, Fab', F(ab')₂, Fab'-SH, scFv-Fc ou Fc.

[0023] La digestion enzymatique des immunoglobulines par la papaïne génère deux fragments identiques, qu'on appelle les fragments Fab (Fragment antigen binding), et un fragment Fc (Fragment cristallisable). La digestion enzymatique des immunoglobulines par la pepsine génère un fragment F(ab')₂ et un fragment Fc scindé en plusieurs peptides. F(ab')₂ est formé de deux fragments Fab' liés par des ponts disulfures intercaténaires. Les parties Fab sont constituées des régions variables et des domaines CH1 et CL. Le fragment Fab' est constitué de la région Fab et d'une région charnière. Fab'-SH fait référence à un fragment Fab' dans lequel le résidu cystéine de la région charnière porte un groupe thiol libre. Le scFv (single chain Fragment variable) est un fragment issu de l'ingénierie des protéines qui est constitué uniquement des domaines variables VH et VL. La structure est stabilisée par un court bras peptidique flexible, appelé linker, qui est placé entre les deux domaines. Le fragment scFv peut être lié à un fragment Fc pour donner un scFv-Fc.

[0024] Le terme « CD56 » désigne le « Cluster de Différenciation 56 », qui est une glycoprotéine membranaire membre de la super-famille des immunoglobulines (Ig) contenant 5 domaines de type Ig et deux domaines de type 3 de la fibronectine dans sa

partie extracellulaire. Le CD56 est aussi appelé fréquemment « Neural-Cell Adhesion Molecule 1 (NCAM 1) ».

- [0025] Le terme « cancer CD56+ » ou « cancer CD56 positif » désigne un cancer exprimant le CD56. En particulier, le terme « cancer CD56+ » désigne tout cas de cancer pour lequel des cellules cancéreuses présentent une expression du CD56. Une expression du CD56 est fréquemment observée dans les carcinomes neuroendocrines, les tumeurs pédiatriques et certaines hémopathies. Elle est également rapportée dans certains mélanomes et sarcomes de tissus mous. De préférence, dans le cadre de la présente invention, le cancer CD56+ est choisi parmi le mélanome, les tumeurs de blastème, les hémopathies, telles que les leucémies aiguës myéloïdes, les myélomes, les néoplasies à cellules dendritiques plasmacytoïdes blastiques et les carcinomes neuroendocrines, tels que le carcinome à petites cellules du poumon et le carcinome à cellules de Merkel. Dans un mode de réalisation préféré, le cancer CD56+ est un carcinome choisi parmi les carcinomes neuroendocrines, tel que le carcinome à petites cellules du poumon ou le carcinome à cellules de Merkel, de préférence le carcinome à cellules de Merkel.
- [0026] Au sens de la présente invention, « l'identité » ou « l'homologie » est calculée en comparant deux séquences alignées dans une fenêtre de comparaison. L'alignement des séquences permet de déterminer le nombre de positions (nucléotides ou acides aminés) en commun pour les deux séquences dans la fenêtre de comparaison. Le nombre de positions en commun est donc divisé par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison et multiplié par 100 pour obtenir le pourcentage d'identité. La détermination du pourcentage d'identité de séquence peut être effectuée manuellement ou grâce à des programmes informatiques bien connus.
- [0027] Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, l'identité ou l'homologie correspond à au moins une substitution, par exemple 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 substitutions, d'un résidu d'acide aminé, de préférence au moins une substitution d'un résidu d'acide aminé réalisée de façon conservative. La « substitution d'un résidu d'acide aminé réalisée de façon conservative » consiste à remplacer un résidu d'acide aminé par un autre résidu d'acide aminé, ayant une chaîne latérale possédant des propriétés similaires. Les familles d'acides aminés possédant des chaînes latérales avec des propriétés similaires sont bien connues, on peut citer par exemple les chaînes latérales basiques (ex. lysine, arginine, histidine), les chaînes latérales acides (ex. acide aspartique, acide glutamique), les chaînes latérales polaires et non chargées (ex. glycine, asparagine, glutamine, serine, thréonine, tyrosine, cystéine), les chaînes latérales apolaires (ex. glycine, cystéine, alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phénylalanine, méthionine, tryptophane), les chaînes latérales beta-ramifiées (ex. thréonine, valine, isoleucine) et les chaînes latérales aromatiques (ex. tyrosine, phénylalanine, tryptophane, histidine).

- [0028] Les anticorps ou fragments d'anticorps homologues ou « variants d'anticorps ou de fragments d'anticorps » (c'est-à-dire des anticorps ou fragments d'anticorps ayant la même fonction) possèdent donc certains acides aminés qui peuvent être substitués par d'autres acides aminés au niveau des régions constantes et/ou des régions variables, sans perdre la capacité de liaison à l'antigène. Il est préférable que cette substitution soit réalisée au sein de la séquence d'ADN qui code pour l'anticorps ou le fragment d'anticorps, c'est-à-dire que la substitution soit conservative en nature. L'Homme du métier utilise ses connaissances générales pour déterminer le nombre de substitutions qui peuvent être réalisés et leur localisation afin de pouvoir conserver la fonction de l'anticorps ou du fragment d'anticorps. Afin de déterminer la capacité d'un ou plusieurs variants d'anticorps ou de fragment d'anticorps à se lier spécifiquement à un antigène, plusieurs méthodes appropriées, bien connues de l'homme du métier et décrites dans l'art antérieur, peuvent être utilisées. Les anticorps ou les fragments d'anticorps peuvent donc être testés par les méthodes de liaison, comme par exemple la méthode ELISA, la méthode par chromatographie d'affinité, etc. Les variants d'anticorps ou de fragments d'anticorps peuvent être générés par exemple par la méthode de « phage display » permettant de générer une librairie de phage. Un grand nombre de méthodes sont connues afin de générer une librairie de « phage display » et cibler les variants d'anticorps ou de fragments d'anticorps ayant les caractéristiques fonctionnelles recherchées.
- [0029] Par « purifié » et « isolé », on entend, en se référant à un anticorps selon l'invention, que l'anticorps est présent en l'absence substantielle d'autres macromolécules biologiques du même type. Le terme "purifié" tel qu'utilisé ici signifie de préférence au moins 75% en masse, plus préféablement au moins 85% en masse, encore plus préféablement au moins 95% en masse, et le plus préféablement au moins 98% en masse d'anticorps, par rapport à l'ensemble des macromolécules présentes.
- [0030] Le terme « pharmaceutiquement acceptable » signifie approuvé par une agence réglementaire fédérale ou d'État ou énuméré dans la pharmacopée américaine ou européenne, ou dans une autre pharmacopée généralement reconnue, destiné à être utilisé chez les animaux et chez l'homme. Une « composition pharmaceutique » désigne une composition comprenant un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Par exemple, un véhicule pharmaceutiquement acceptable peut être un diluant, un adjuvant, un excipient ou un véhicule avec lequel l'agent thérapeutique est administré. Ces véhicules peuvent être des liquides stériles, tels que l'eau et des huiles, y compris ceux d'origine pétrolière, animale, végétale ou synthétique, tels que l'huile d'arachide, l'huile de soja, l'huile minérale, l'huile de sésame, etc. L'eau est un véhicule préféré lorsque la composition pharmaceutique est administrée par voie intraveineuse. Des solutions salines et des solutions aqueuses de dextrose et de glycérol peuvent également être utilisées

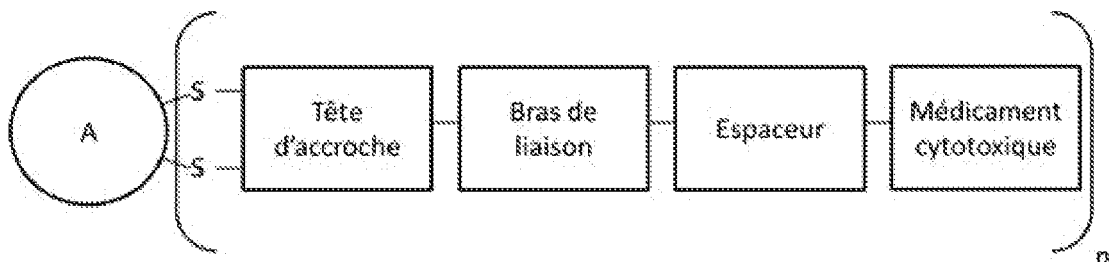
comme véhicules liquides, en particulier pour les solutions injectables. Les excipients pharmaceutiquement acceptables comprennent l'amidon, le glucose, le lactose, le saccharose, le stéarate de sodium, le monostéarate de glycérol, le talc, le chlorure de sodium, le lait écrémé en poudre, le glycérol, le propylène glycol, l'eau, l'éthanol et similaires. Lorsque la composition pharmaceutique est adaptée à une administration orale, les comprimés ou les gélules peuvent être préparés par des moyens classiques avec des excipients pharmaceutiquement acceptables tels que des agents liants (par exemple de l'amidon de maïs pré-gélatinisé, de la polyvinylpyrrolidone ou de l'hydroxypropyl méthylcellulose); des charges (par exemple du lactose, de la cellulose microcristalline ou de l'hydrogénophosphate de calcium); des lubrifiants (par exemple, stéarate de magnésium, talc ou silice); des délitants (par exemple l'amidon de pomme de terre ou le glycolate d'amidon sodique); ou des agents mouillants (par exemple, le laurylsulfate de sodium). Les comprimés peuvent être enrobés par des procédés bien connus dans l'état de la technique. Les préparations liquides pour administration orale peuvent prendre la forme, par exemple, de solutions, de sirops ou de suspensions, ou peuvent être présentées sous forme de produit sec à reconstituer avec de l'eau ou un autre véhicule approprié avant utilisation. De telles préparations liquides peuvent être préparées par des moyens classiques avec des véhicules pharmaceutiquement acceptables tels que des agents de suspension (par exemple un sirop de sorbitol, des dérivés de la cellulose ou des graisses comestibles hydrogénées); des agents émulsifiants (par exemple, la lécithine ou l'acacia); véhicules non aqueux (par exemple huile d'amande, esters huileux, alcool éthylique ou huiles végétales fractionnées); et des conservateurs (par exemple des *p*-hydroxybenzoates de méthyle ou de propyle ou de l'acide sorbique). Les compositions pharmaceutiques peuvent également contenir des sels tampons, des aromatisants, des colorants et des édulcorants, selon le cas. La composition selon l'invention est de préférence une composition pharmaceutique.

[0031] Le terme « traiter » ou « traitement » englobe tout effet bénéfique ou souhaitable sur une pathologie ou un état pathologique, et peut même inclure une réduction minimale d'un ou plusieurs marqueurs mesurables de la pathologie ou de l'état pathologique. Le traitement peut par exemple impliquer soit la réduction ou l'amélioration des symptômes de la pathologie ou de l'état pathologique, soit le retardement de la progression de la maladie ou de l'état pathologique. Le terme « traitement » ne signifie pas nécessairement l'éradication complète ou la guérison de la pathologie, ni des symptômes associés.

[0032] On entend par « spectrométrie de masse native » une analyse de spectrométrie de masse réalisée dans des conditions ne dénaturant pas les protéines, permettant ainsi de conserver les liaisons non-covalentes. Des procédés de spectrométrie de masse native sont largement décrits dans la littérature, par exemple dans la référence [4].

[0033] Conjugué anticorps-médicament

[0034] L'invention concerne un conjugué anticorps-médicament de formule (I) suivante :
[Chem. 1]

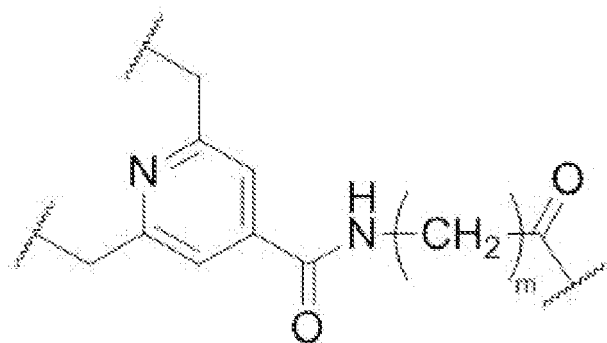


dans laquelle :

A est un anticorps ou un fragment d'anticorps anti-CD56 ;

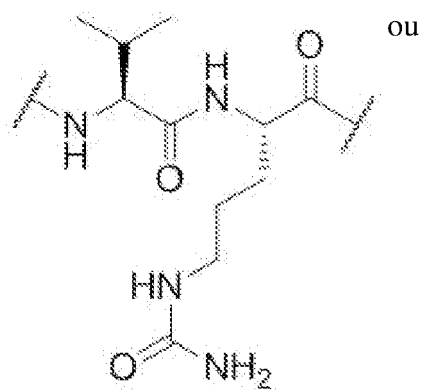
la tête d'accroche est représenté par la formule suivante :

[Chem. 2]



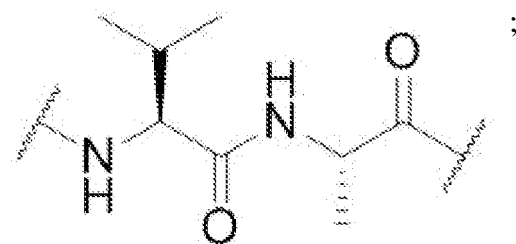
le bras de liaison est un bras de liaison clivable choisi parmi les formules suivantes :

[Chem. 3]



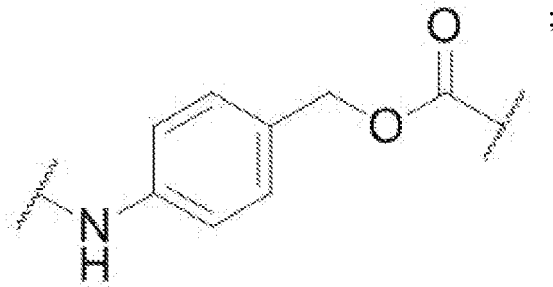
ou

[Chem. 4]



l'espaceur est représenté par la formule suivante :

[Chem. 5]



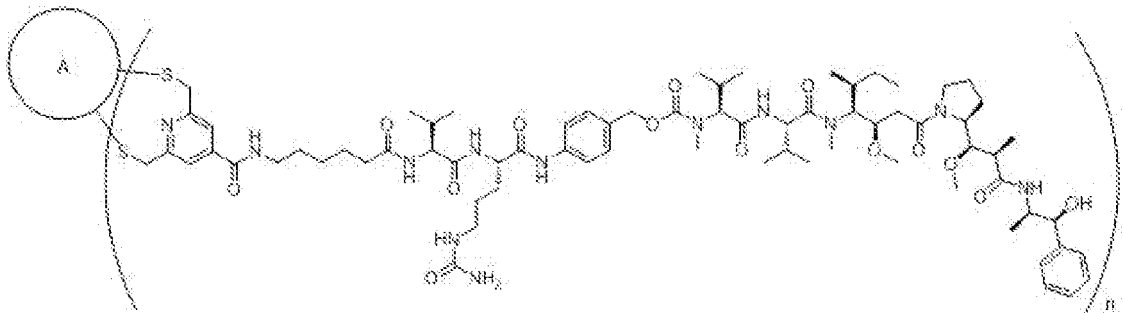
m est un entier allant de 1 à 10, avantageusement allant de 2 à 7, de 3 à 6, avantageusement égal à 5 ;

n est un entier allant de 1 à 4.

- [0035] L'anticorps ou le fragment d'anticorps anti-CD56 selon l'invention peut être d'origine mammifère (ex. humain ou de souris), humanisé ou chimérique. Il s'agit de préférence d'un anticorps monoclonal produit de manière recombinante par des cellules génétiquement modifiées selon des techniques largement décrites dans l'art antérieur.
- [0036] Lorsque A est un anticorps anti-CD56, il s'agit de préférence d'une IgG, par exemple IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4.
- [0037] Dans un mode de réalisation particulier, A est un anticorps ou un fragment d'anticorps anti-CD56 qui comprend :
- un domaine variable d'une chaîne légère comprenant un CDR1 de séquence d'acides aminés SEQ ID NO: 1, un CDR2 de séquence en acides aminés SEQ ID NO: 2, et un CDR3 de séquence en acides aminés SEQ ID NO: 3 ; et
 - un domaine variable d'une chaîne lourde comprenant un CDR1 de séquence d'acides aminés SEQ ID NO: 4, un CDR2 de séquence d'acides aminés SEQ ID NO: 5, et un CDR3 de séquence d'acides aminés SEQ ID NO: 6.
- [0038] Dans ce mode de réalisation particulier, le domaine variable de chaîne légère présente au moins 80% d'homologie, de préférence au moins 90% d'homologie, par exemple au moins 95% d'homologie, au moins 96%, au moins 97%, au moins 98%, au moins 99% ou même 100% d'homologie avec la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 15 ; et le domaine variable de chaîne lourde présentant au moins 80% d'homologie, de préférence au moins 90% d'homologie, par exemple au moins 95% d'homologie, au moins 96%, au moins 97%, au moins 98%, au moins 99% ou même 100% d'homologie avec la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 16.
- [0039] Ainsi, A peut être un anticorps ou un fragment d'anticorps de séquence en acides aminés SEQ ID NO : 15 pour le domaine variable de la chaîne légère et de séquence en acides aminés SEQ ID NO : 16 pour le domaine variable de la chaîne lourde.

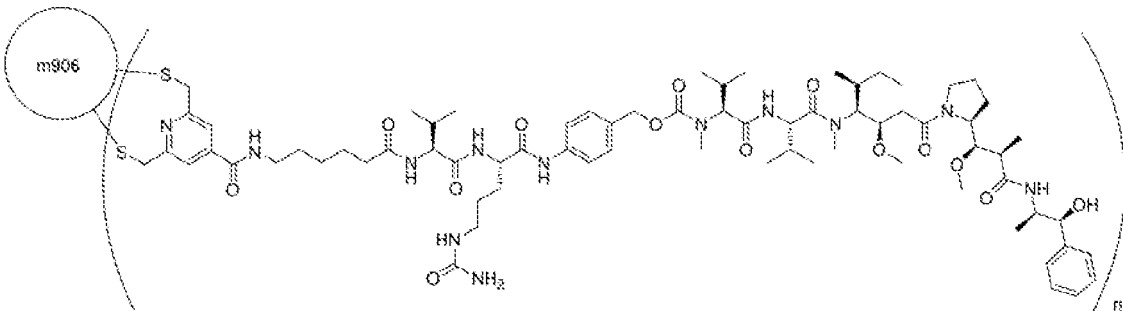
- [0040] Dans un mode de réalisation particulier, A est un anticorps de séquence en acides aminés SEQ ID NO : 7 pour la chaîne légère et de séquence en acides aminés SEQ ID NO : 8 pour la chaîne lourde. La chaîne lourde de séquence en acides aminés SEQ ID NO : 8 peut également présenter une lysine additionnelle en position C terminal.
- [0041] Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, A est l'anticorps décrit sous la référence m906 dans la demande US 2018/0214568 A1 et dans référence [1]. L'anticorps m906 est un anticorps anti-CD56 chimérique de type IgG1 de séquence en acides aminés SEQ ID NO : 7 pour la chaîne légère et de séquence en acides aminés SEQ ID NO : 8 pour la chaîne lourde.
- [0042] Dans un mode de réalisation particulier, le conjugué anticorps-médicament de l'invention a la formule suivante :

[Chem. 10]



- [0043] Dans un mode de réalisation particulier, lorsque A est m906, le conjugué anticorps-médicament de l'invention a la formule (Ia) suivante :

[Chem. 11]



- [0044] Le conjugué anticorps-médicament identifié dans les exemples sous la référence « MF-m906-MMAE » correspond à un conjugué anticorps-médicament de formule (Ia). « m906 » correspond à l'anticorps m906, c'est-à-dire un anticorps anti-CD56 chimérique de type IgG1 de séquence en acides aminés SEQ ID NO : 7 pour la chaîne légère et de séquence en acides aminés SEQ ID NO : 8 pour la chaîne lourde.
- [0045] Avantageusement, le conjugué anticorps-médicament selon l'invention est purifié (ou isolé) en mettant en œuvre des techniques de purification connues, telle que la purification sur colonne de chromatographie et / ou d'affinité.
- [0046] Lorsque n est égal à 1, le conjugué anticorps-médicament est communément appelé

« DAR1 ». Lorsque n est égal à 2, le conjugué anticorps-médicament est communément appelé « DAR2 ». Lorsque n est égal à 3, le conjugué anticorps-médicament est communément appelé « DAR3 ». Lorsque n est égal à 4, le conjugué anticorps-médicament est communément appelé « DAR4 ».

[0047] Dans un mode de réalisation particulier, le conjugué anticorps-médicament présente une ou plusieurs fonctions effectrices médiées par la partie Fc atténuée. De préférence, la ou les fonctions effectrices médiées par la partie Fc est/sont choisies parmi l'ADCC (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) et la CDC (Complement-dependent cytotoxicity). L'Homme du métier n'aura aucune difficulté à atténuer une ou plusieurs fonctions effectrices médiées par la partie Fc au regard de l'enseignement de l'art antérieur, par exemple en mutant la partie Fc. De nombreuses mutations sont connues pour diminuer les fonctions effectrices médiées par la partie Fc. Il peut s'agir par exemple d'une mutation visant à déglycosyler de la partie Fc, notamment à supprimer la glycosylation au niveau de l'asparagine 297.

[0048] Dans un mode de réalisation particulier, le conjugué anticorps-médicament est déglycosylé au niveau de la partie Fc, par exemple le conjugué anticorps-médicament ne porte plus de glycosylation au niveau de l'asparagine 297.

[0049] Composition

[0050] L'invention concerne également une composition comprenant un ou plusieurs conjugué(s) anticorps-médicament de formule (I), par exemple de formule (Ia), tel que défini ci-dessus. Il peut s'agir d'une composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs conjugué(s) anticorps-médicament de formule (I) tel que défini ci-dessus, par exemple de formule (Ia), et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

[0051] La composition selon l'invention a la caractéristique d'être particulièrement homogène, ce qui peut se traduire par une meilleure stabilité, une meilleure efficacité et/ou une diminution des effets secondaires de la composition, par rapport à une composition qui n'est pas homogène.

[0052] Avantageusement, lorsque A est un anticorps, par exemple m906, la composition selon l'invention se caractérise par les caractéristiques suivantes :

a) au moins 50%, de préférence au moins 55%, au moins 60%, au moins 65%, par exemple au moins 70%, au moins 75%, au moins 80%, au moins 85%, au moins 90%, au moins 95%, au moins 96%, au moins 97%, au moins 98% ou au moins 99% des conjugués anticorps-médicament de la composition ont un n égal à 4 ;

b) le Drug-to-Antibody Ratio moyen (DAR moyen) est compris entre 3 et 4,5, de préférence compris entre 3,5 et 4, entre 3,7 et 4, entre 3,8 et 4, par exemple égal à $3,9 \pm 0,1$, par exemple égal à 3,89. Le DAR moyen est généralement déterminé par la méthode HIC (Hydrophobic Interaction Chromatography) ou par spectrométrie de masse native. La méthode HIC et la méthode de spectrométrie de masse native sont

largement décrites dans la littérature. Il peut être cité par exemple la référence [3] pour la méthode HIC et la référence [4] pour la méthode de spectrométrie de masse native ;
 c) au moins 95%, de préférence au moins 96%, au moins 97%, au moins 98%, au moins 99% des conjugués anticorps-médicament sont présents sous forme de monomère. Le pourcentage de monomère est généralement déterminé par la méthode SEC (Size Exclusion Chromatography). La méthode SEC est largement décrites dans la littérature, par exemple dans la référence [2] ;

d) un ou plusieurs des ratios de n définis ci-après ; ou

e) une combinaison de deux, trois ou quatre caractéristiques choisies parmi a), b, c) et d).

[0053] Lorsque A est un anticorps, par exemple m906, la composition selon l'invention peut se caractériser par des ratios de n ci-après :

- moins de 5%, moins de 4%, moins de 3%, moins de 2%, moins de 1%, moins de 0,75%, moins de 0,5%, moins de 0,25%, moins de 0,2%, moins de 0,1%, par exemple environ 0% des conjugués anticorps-médicament de la composition ont un n égal à 1,

- moins de 10%, moins de 9%, moins de 8%, moins de 7%, moins de 6%, moins de 5%, moins de 4%, moins de 3%, moins de 2%, moins de 1% des conjugués anticorps-médicament de la composition ont un n égal à 2,

- moins de 25%, moins de 20%, moins de 18%, moins de 17% des conjugués anticorps-médicament de la composition ont un n égal à 3, et / ou

- au moins 50%, au moins 55%, au moins 56%, au moins 57%, au moins 58%, au moins 59%, au moins 60%, au moins 65%, au moins 70%, au moins 71%, au moins 72%, au moins 73%, au moins 74% des conjugués anticorps-médicament de la composition ont un n égal à 4.

[0054] Lorsque A est un anticorps, par exemple m906, la composition selon l'invention peut également se caractériser par des ratios de n ci-après :

- entre 0% et 5%, entre 0% et 2%, entre 0% et 1%, entre 0% et 0,75%, entre 0% et 0,5%, entre 0% et 0,25%, entre 0% et 0,1% des conjugués anticorps-médicament de la composition ont un n égal à 1,

- entre 0% et 10%, entre 0% et 7%, entre 0% et 6%, entre 3% et 6%, entre 5% et 6%, entre 0% et 5%, entre 0% et 4%, entre 0% et 3%, entre 0% et 2%, entre 0% et 1% des conjugués anticorps-médicament de la composition ont un n égal à 2,

- entre 0% et 25%, entre 5% et 20%, entre 10% et 20%, entre 15% et 17% des conjugués anticorps-médicament de la composition ont un n égal à 3, et

- entre 50 et 85%, entre 50% et 80%, entre 50% et 75%, entre 70% et 85%, entre 70% et 80%, entre 70% et 75%, entre 50% et 60%, entre 55% et 60%, des conjugués anticorps-médicament de la composition ont un n égal à 4.

[0055] Les ratios de n peuvent être déterminés par la méthode HIC (Hydrophobic Interaction

Chromatography) ou par spectrométrie de masse native.

- [0056] Dans un premier mode de réalisation particulier, lorsque A est un anticorps, par exemple m906, la composition selon l'invention peut se caractériser par des ratios de n déterminés par la méthode HIC (Hydrophobic Interaction Chromatography) ci-après :
- moins de 5%, moins de 4%, moins de 3%, moins de 2%, moins de 1%, moins de 0,75%, moins de 0,5%, moins de 0,25%, moins de 0,2%, moins de 0,1% des conjugués anticorps-médicament de la composition ont un n égal à 1,
 - moins de 10%, moins de 9%, moins de 8%, moins de 7%, moins de 6%, par exemple environ 5,5% des conjugués anticorps-médicament de la composition ont un n égal à 2,
 - moins de 25%, moins de 20%, moins de 18%, moins de 17%, par exemple environ 16% des conjugués anticorps-médicament de la composition ont un n égal à 3, et / ou
 - au moins 50%, au moins 55%, au moins 56%, au moins 57%, au moins 58%, au moins 59%, par exemple environ 60% des conjugués anticorps-médicament de la composition ont un n égal à 4.
- [0057] Ainsi, lorsque A est un anticorps, par exemple m906, la composition selon l'invention peut également se caractériser par des ratios de n déterminés par la méthode HIC (Hydrophobic Interaction Chromatography) ci-après :
- entre 0% et 5%, entre 0% et 2%, entre 0% et 1%, entre 0% et 0,75%, entre 0% et 0,5%, entre 0% et 0,25%, entre 0% et 0,1% des conjugués anticorps-médicament de la composition ont un n égal à 1,
 - entre 0% et 10%, entre 0% et 7%, entre 0% et 6%, entre 3% et 6%, entre 5% et 6% des conjugués anticorps-médicament de la composition ont un n égal à 2,
 - entre 0% et 25%, entre 5% et 20%, entre 10% et 20%, entre 15% et 17% des conjugués anticorps-médicament de la composition ont un n égal à 3, et
 - entre 50 et 75%, entre 50% et 60%, entre 55% et 60%, des conjugués anticorps-médicament de la composition ont un n égal à 4.
- [0058] Dans un deuxième mode de réalisation particulier, lorsque A est un anticorps, par exemple m906, la composition selon l'invention peut se caractériser par des ratios de n déterminés par spectrométrie de masse native ci-après :
- moins de 5%, moins de 4%, moins de 3%, moins de 2%, moins de 1%, moins de 0,75%, moins de 0,5%, moins de 0,25%, moins de 0,2%, moins de 0,1%, par exemple environ 0% des conjugués anticorps-médicament de la composition ont un n égal à 1,
 - moins de 10%, moins de 9%, moins de 8%, moins de 7%, moins de 6%, moins de 5%, moins de 4%, moins de 3%, moins de 2%, moins de 1%, par exemple environ 0% des conjugués anticorps-médicament de la composition ont un n égal à 2,
 - moins de 25%, moins de 20%, moins de 18%, moins de 17% des conjugués anticorps-médicament de la composition ont un n égal à 3, et / ou

- au moins 50%, au moins 55%, au moins 56%, au moins 57%, au moins 58%, au moins 59%, au moins 60%, au moins 65%, au moins 70%, au moins 71%, au moins 72%, au moins 73%, au moins 74% des conjugués anticorps-médicament de la composition ont un n égal à 4.

[0059] Ainsi, lorsque A est un anticorps, par exemple m906, la composition selon l'invention peut également se caractériser par des ratios de n déterminés par spectrométrie de masse native ci-après :

- entre 0% et 5%, entre 0% et 2%, entre 0% et 1%, entre 0% et 0,75%, entre 0% et 0,5%, entre 0% et 0,25%, entre 0% et 0,1% des conjugués anticorps-médicament de la composition ont un n égal à 1,

- entre 0% et 10%, entre 0% et 7%, entre 0% et 6%, entre 0% et 5%, entre 0% et 4%, entre 0% et 3%, entre 0% et 2%, entre 0% et 1% des conjugués anticorps-médicament de la composition ont un n égal à 2,

- entre 0% et 25%, entre 5% et 20%, entre 10% et 20%, entre 15% et 17% des conjugués anticorps-médicament de la composition ont un n égal à 3, et

- entre 50 et 85%, entre 50% et 80%, entre 50% et 75%, entre 70% et 85%, entre 70% et 80%, entre 70% et 75% des conjugués anticorps-médicament de la composition ont un n égal à 4. Lorsque A est un anticorps, la composition selon l'invention peut également comprendre des DAR0, c'est-à-dire des anticorps sans conjugué cytotoxique. De préférence, moins de 10%, moins de 9%, moins de 8%, moins de 7%, moins de 6%, moins de 5%, moins de 4%, moins de 3%, moins de 2%, moins de 1%, moins de 0,5%, moins de 0,4%, moins de 0,2%, moins de 0,1% de DAR0, par exemple environ 0% de DAR0. Le pourcentage de DAR0 peut être déterminé par la méthode HIC (Hydrophobic Interaction Chromatography) ou par spectrométrie de masse native.

[0060] La composition selon l'invention peut également comprendre des DAR5, c'est-à-dire des conjugués anticorps-médicament ayant 5 conjugués cytotoxiques. De préférence, moins de 25%, moins de 20%, moins de 15%, moins de 10%, moins de 9%, moins de 8%, moins de 7%, moins de 6%, moins de 5% de DAR5. La présence de DAR5 dans des compositions de conjugués anticorps-médicament est largement décrite dans la littérature, néanmoins la structure exacte des DAR5 est peu étudiée. Ainsi, le DAR moyen est calculé en tenant compte de l'ensemble des DARs présents dans la composition, c'est-à-dire les DAR0, les DAR1 (i.e. n=1), les DAR2 (i.e. n=2), les DAR3 (i.e. n=3), les DAR4 (i.e. n=4), les DAR5, etc. De préférence, lorsque A est un anticorps, la composition selon l'invention ne comprend pas de DAR supérieur à DAR5, par exemple DAR6, DAR7, etc. Les pourcentages de DAR5 et plus peuvent être déterminés par la méthode HIC (Hydrophobic Interaction Chromatography) ou par spectrométrie de masse native. Dans un mode de réalisation très particulier, la composition selon l'invention présente le profil HIC de la Figure 1 ou le profil de spec-

trométrie de masse native de la Figure 3.

[0061] Utilisation thérapeutique

[0062] L'invention concerne également un conjugué anticorps-médicament de formule (I) selon l'invention ou une composition comprenant un conjugué anticorps-médicament de formule (I) selon l'invention pour utilisation comme médicament, par exemple pour utilisation dans le traitement d'un cancer CD56+, tel que le mélanome, les tumeurs de blastème, les hémopathies, telles que les leucémies aiguës myéloïdes, les myélomes, les néoplasies à cellules dendritiques plasmacytoïdes blastiques et les carcinomes neuroendocrines. Avantageusement, le cancer CD56+ est choisi parmi les carcinomes neuroendocrines, tel que le carcinome à petites cellules du poumon ou le carcinome à cellules de Merkel, de préférence le carcinome à cellules de Merkel.

[0063] Le conjugué anticorps-médicament ou la composition selon l'invention est de préférence formulé pour une administration parentérale, par exemple une administration intravasculaire (intraveineuse ou intra-artérielle), intrapéritonéale ou intramusculaire. Le terme « administré par voie parentérale », tel qu'utilisé ici, désigne des modes d'administration autres que l'administration entérale et topique, généralement par injection, et comprend, sans limitation, l'administration intravasculaire, intraveineuse, intramusculaire, intra-artérielle, intrathapsale, intracapsulaire, intraorbitaire, intratumorale, intracardiaque, intradermique, intra-péritonéale, par injection, perfusion transtrachéale, sous-cutanée, intra-articulaire, sous-capsulaire, sous-arachnoïdienne, intraspinale et intrasternale. L'administration par voie intraveineuse est préférée dans le cadre de la présente invention, par exemple par perfusion intraveineuse.

[0064] La dose de conjugué anticorps-médicament administrée à un sujet qui en a besoin variera en fonction de plusieurs facteurs, y compris, sans limitation, la voie d'administration, le type et la gravité de la pathologie traitée, l'état du patient, la corpulence du patient, l'âge du patient, etc. L'Homme du métier peut facilement déterminer, sur la base de ses connaissances dans ce domaine, la plage posologique requise en fonction de ces facteurs et d'autres. La dose appropriée peut également être déterminée avec des modèles animaux ou avec des essais cliniques. Par exemple, les doses typiques de conjugué anticorps-médicament selon l'invention peuvent être de 5 mg/m² à 250 mg/m², par exemple de 30 mg/m² à 150 mg/m², de 5 mg/m² à 75 mg/m², de 75 mg/m² à 120 mg/m², par exemple égale à 100 mg/m², 75 mg/m², 60 mg/m². L'administration peut se faire en une seule fois ou, plus généralement, en plusieurs fois. Le schéma d'administration peut comprendre une dose de charge initiale puis des doses d'entretien, par exemple hebdomadaires, toutes les 2 semaines, toutes les trois semaines, tous les mois, ou plus. La durée de traitement peut varier selon la pathologie traitée et le sujet.

[0065] Le conjugué anticorps-médicament ou la composition selon l'invention peut être

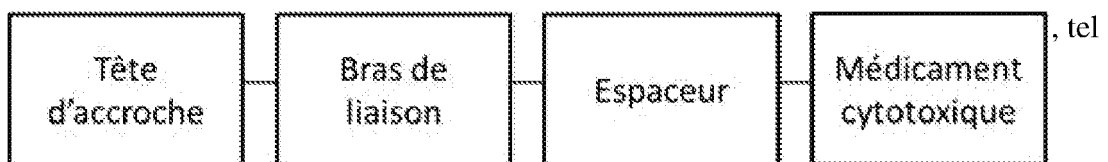
utilisé en monothérapie ou en association avec des médicaments dont l'intérêt thérapeutique est reconnu dans la pathologie considérée. Il peut s'agir par exemple du paclitaxel, du docétaxel, de la doxorubicine, du cyclophosphamide, du lenalidomide, de la dexaméthasone, du carboplatine, de l'etoposide, ou d'un anticorps utilisé en immunothérapie anti-cancéreuse tel qu'un anti-PD1 ou anti-PD-L1.

[0066] La description concerne également une méthode de traitement d'un cancer CD56+ chez un sujet comprenant l'administration au sujet d'une quantité thérapeutique efficace d'un conjugué anticorps-médicament de formule (I) selon l'invention ou d'une composition comprenant un conjugué anticorps-médicament de formule (I) selon l'invention.

[0067] Procédé de préparation

La description concerne également un procédé de préparation d'un anticorps-médicament de formule (I) tel que défini ci-dessus, dans lequel on fait réagir un conjugué cytotoxique de formule (II) suivante :

[Chem. 6]



que défini ci-dessus, avec un anticorps ou un fragment d'anticorps anti-CD56 tel que défini ci-dessus.

Brève description des figures

[0068] [fig.1] représente le profil HIC (Hydrophobic Interaction Chromatography) d'une composition de conjugué anticorps-médicament selon l'invention. La figure montre que la composition est enrichie en DAR4, avec plus de 50% de DAR4.

[0069] [fig.2] représente une analyse SEC (Size Exclusion Chromatography) d'une composition de conjugué anticorps-médicament selon l'invention. La figure montre que la composition est extrêmement homogène, avec plus de 99% de monomère.

[0070] [fig.3] représente une analyse spectrométrique de masse native sur un spectromètre de masse Vion IMS Qtof couplé à un système Acquity UPLC H-Class de Waters (Wilmslow, UK) d'une composition de conjugué anticorps-médicament selon l'invention. Cette méthode permet d'identifier avec certitude chaque espèce de DAR. La figure montre que la composition est enrichie en DAR4, avec près de 75% de DAR4.

[0071] [fig.4] représente l'expression du CD56 sur différentes lignées cellulaires (4 de CCM et une lignée contrôle de cancer du sein) par cytométrie en flux après incubation avec l'anticorps anti-CD56 marqué avec le fluorophore FITC (Fluorescein IsoThioCyanate).

[0072] [fig.5A], [Fig 5B], [Fig 5C], [Fig 5D], [Fig 5E] représentent l'évaluation des per-

formances de l'ADC MF-m906-MMAE, comparées aux contrôles m906 (anticorps non couplé), MF-TTZ-MMAE (ADC Trastuzumab couplé à MMAE) et MMAE (toxine seule) sur les lignées cellulaires de CCM (Figure 5A : WaGa, Figure 5B : PeTa, Figure 5C : MS-1 et Figure 5D : MKL-2) et de cancer du sein (Figure 5E : SK-BR3). Les expériences ont été réalisées de façon indépendante deux fois (6 réplicats biologiques/expérience). Les résultats sont exprimés en moyenne (+/-SEM) du pourcentage obtenu.

[0073] [fig.6A-6C] représente l'évaluation de la spécificité de MF-m906-MMAE dans les lignées WaGa après knock-down du CD56. Les cellules WaGa ont été transduites indépendamment avec des vecteurs lentiviraux contenant deux shRNA distincts inducibles par doxycycline (Dox) (A, B et C) et ciblant les séquences du CD56. Après sélection antibiotique (puromycine), les cellules ont été exposées à la doxycycline pendant 7 jours avant évaluation. (A-B-C) : Confirmation du knock-down du CD56 par RT- qPCR en temps réel (A) (*: $p < 0.05$, les cellules contrôles sans doxycycline sont utilisées en tant que référence), par Western blot (masse atténue du CD56 = 140 KDa) (B). (C) Évaluation de l'effet cytotoxique de MF-m906-MMAE sur les cellules exprimant le CD56 (-Dox) ou non (+Dox) en utilisant trois shRNA différents (Sh RNA A, Sh RNA B et Sh RNA C). Les expériences ont été réalisées de façon indépendante deux fois (6 réplicats biologiques/expérience). Les résultats sont exprimés en moyenne (+/-SEM) du pourcentage obtenu.

[0074] [fig.7] illustre l'évaluation des performances du conjugué MF-m906-MMAE et des contrôles (PBS et MF-TTZ-MMAE un ADC Trastuzumab couplé à MMAE) en modèle xénogreffes de CCM. La Figure 7 représente les courbes de volume tumoral relatif (moyenne +/-SEM) durant l'étude. Les volumes tumoraux relatifs (VTR) sont calculés en utilisant comme référence le volume tumoral de début d'étude (Volume à $j_0 = 100\%$). Chaque point représente la moyenne de VTRs pour les groupes traités par le MF-m906-MMAE, le MF-TTZ-MMAE et le PBS, les flèches grises indiquent les temps d'injections.

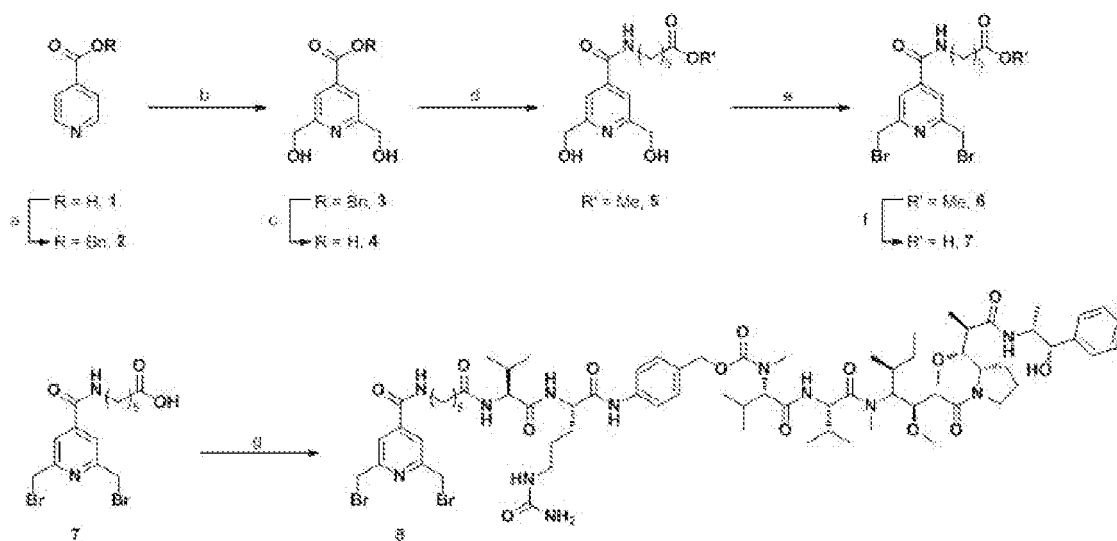
[0075] [fig.8] illustre l'évaluation des performances du conjugué MF-m906-MMAE et des contrôles (PBS et MF-TTZ-MMAE un ADC Trastuzumab couplé à MMAE) en modèle xénogreffes de CCM. La figure 8 représente le poids des tumeurs en fin d'étude dans le groupe expérimental et les groupes contrôles (*: $p < 0.05$). Les lignes horizontales sont les moyennes, les quartiles et les limites.

Exemples

[0076] **Exemple 1 : s synthèse d'un conjugué cytotoxique selon l'invention**

[0077] **Schéma réactionnel général**

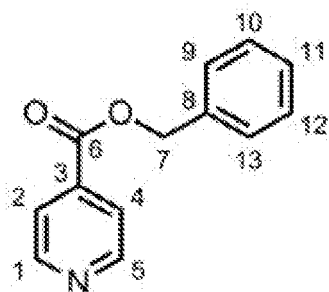
[Chem.12]



(a) BnOH, SOCl₂, DCM, 18h, 75 °C; (b) APS, MeOH, H₂O, H₂SO₄, 1h, 50 °C; (c) H₂, Pd/C, MeOH, 2h, TA; (d) HATU, 2,6-lutidine, DMF, H₂N-(CH₂)₅-COOMe, 15h, 0 °C, puis TA; (e) PBr₃, MeCN, 2h, 45 °C; (f) LiOH, THF, H₂O, 8,5h, TA; (g) EEDQ, DIPEA, DMF, MeCN, H₂N-VCPABC-MMAE, 2h20, 25 °C.

[0078] Schéma réactionnel détaillé[0079] **Préparation de l'isonicotinate de benzyne (2)**

[0080] [Chem.13]



(2)

[0081] **L'acide isonicotinique (1)** (5,00 g ; 40,614 mmol ; 1,0 eq) a été solubilisé dans le chlorure de thionyle (15 mL ; 206,77 mmol ; 5,1 eq) et chauffé à reflux pendant la nuit. Après retour à température ambiante, l'excès de chlorure de thionyle a été éliminé par évaporation sous pression réduite, puis le résidu obtenu a été dissous dans le dichlorométhane anhydre (55 mL). L'alcool benzylique a été additionné (4,2 mL ; 40,614 mmol ; 1,0 eq) et le mélange a été agité à reflux pendant 10 h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel a été neutralisé avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium et extrait avec du dichlorométhane (3x100 mL). Les phases organiques ont été rassemblées, lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium, séchées sur sulfate de magnésium et concentrées sous pression réduite. Le produit obtenu a été purifié par chromatographie flash (SiO₂, cyclohexane/acétate

d'éthyle 50:50) pour donner **(2)** (6,97 g ; 80%) sous la forme d'une huile incolore.

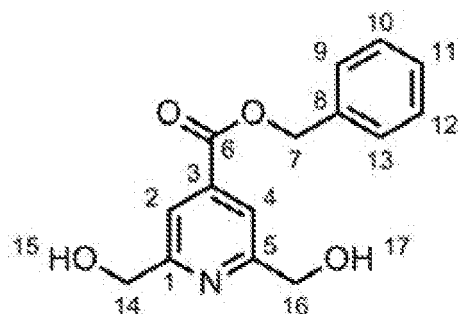
[0082] RMN ^1H (300 MHz, DMSO) δ 8,80 (dd ; $J = 6,1$; 1,6 Hz ; $2\text{H}_{1,5}$), 7,86 (dd ; $J = 6,1$; 1,6 Hz, $2\text{H}_{2,4}$), 7,56 – 7,29 (m ; 5H_{9-13}), 5,39 (s ; 2H_7).

[0083] RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO) δ 165,0 (1C_6) ; 151,3 ($2\text{C}_{1,5}$) ; 137,2 (1C_3) ; 136,1 (1C_8) ; 129,0 ($2\text{C}_{10,12}$) ; 128,8 (1C_{11}) ; 128,6 ($2\text{C}_{9,13}$) ; 123,0 ($2\text{C}_{2,4}$) ; 67,4 (1C_7).

[0084] SMHR (ESI) : masse neutre calculée pour $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_2$ [M] : 213,0790 ; observée 213,0796.

[0085] **Préparation de 2,6-bis(hydroxyméthyl)isonicotinate de benzyle (3)**

[0086] [Chem.14]



(3)

[0087] **L'isonicotinate de benzyle (2)** (2,48 g ; 11,630 mmol ; 1,0 eq) a été solubilisé dans le méthanol (43 mL), agité à 50 °C et de l'acide sulfurique concentré (320 μL ; 6,016 mmol ; 0,52 eq) a été ajouté. Une solution de persulfate d'ammonium (26,500 g ; 116,000 mmol ; 10,0 eq) dans l'eau (43 mL) a été ajoutée en deux étapes : un premier ajout rapide de 30 gouttes, une suspension blanche se forme, puis en goutte à goutte rapide pendant 5 min. La réaction s'emballe jusqu'à 75°C, puis la solution jaune obtenue a été agitée à 50°C pendant 1 h supplémentaire. Après retour à température ambiante, le méthanol a été évaporé sous pression réduite. 50 mL d'acétate d'éthyle ont été ajoutés et le milieu a été neutralisé par ajout d'une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium. La phase aqueuse a été extraite avec de l'acétate d'éthyle (3x100 mL) et les phases organiques rassemblées ont été lavées par une solution saturée de chlorure de sodium, séchées sur sulfate de magnésium, puis concentrées sous pression réduite. Le brut a été purifié par chromatographie flash (SiO_2 , dichlorométhane/méthanol, 95:5) pour donner **(3)** (1,56 g ; 49%) sous la forme d'un solide beige.

[0088] RMN ^1H (300 MHz, DMSO) δ 7,81 (s ; $2\text{H}_{2,4}$) ; 7,55 – 7,32 (m ; 5H_{9-13}) ; 5,60 (t ; $J = 5,9$ Hz ; $2\text{H}_{15,17}$) ; 5,40 (s ; 2H_7) ; 4,59 (d ; $J = 5,9$ Hz ; $4\text{H}_{14,16}$).

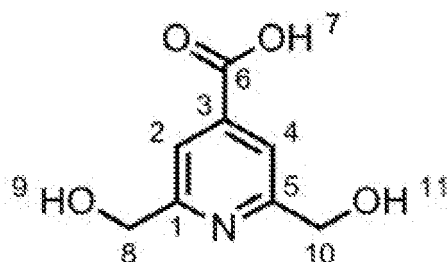
[0089] RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO) δ 165,0 (1C_6) ; 162,8 ($2\text{C}_{1,5}$) ; 138,0 (1C_3) ; 135,7 (1C_8) ; 128,6 ($2\text{C}_{10,12}$) ; 128,4 (1C_{11}) ; 128,3 ($2\text{C}_{9,13}$) ; 117,0 ($2\text{C}_{2,4}$) ; 66,9 (1C_7) ; 63,9 ($2\text{C}_{14,16}$).

[0090] SMHR (ESI) : masse neutre calculée pour $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_4$ [M] : 273,1001 ; observée

273,1001.

[0091] **Préparation de l'acide 2,6-bis(hydroxyméthyl)isonicotinique (4)**

[0092] [Chem.15]



(4)

[0093] Le **2,6-bis(hydroxyméthyl)isonicotinate de benzyle (3)** (1,33 g ; 4,867 mmol ; 1,0 eq) a été dissous dans le méthanol (50 mL) et la solution a été dégazée avec de l'argon pendant 15 min. Du palladium sur charbon 10% wt (133 mg) a été ajouté et le milieu réactionnel a été agité à température ambiante sous atmosphère d'hydrogène pendant 2 h. Le milieu réactionnel a été filtré sur dicalite (rinçage méthanol). Le filtrat a été concentré sous pression réduite pour donner **(4)** (849 mg ; 95%) sous la forme d'un solide beige.

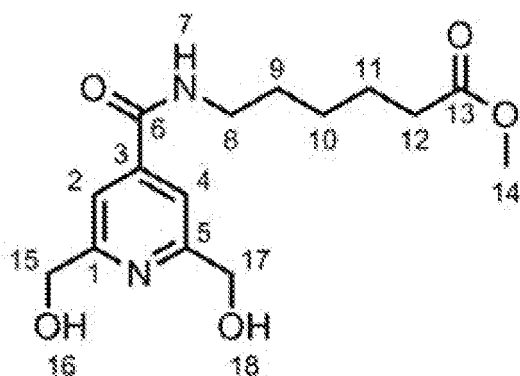
[0094] RMN ^1H (300 MHz, DMSO) δ 7,78 (s ; $2\text{H}_{2,4}$) ; 5,54 (s large ; $2\text{H}_{9,11}$) ; 4,59 (s ; $4\text{H}_{8,10}$).

[0095] RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO) δ 166,7 (1C_6) ; 162,5 ($2\text{C}_{1,5}$) ; 139,4 (1C_3) ; 117,3 ($2\text{C}_{2,4}$) ; 64,0 ($2\text{C}_{8,10}$).

[0096] SMHR (ESI) : masse neutre calculée pour $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_4$ [M] : 183,0532 ; observée 183,0526.

[0097] **Préparation du 6-((2,6-bis(hydroxyméthyl)pyridin-4-yl)amidohexanoate de méthyle (5)**

[0098] [Chem.16]



(5)

[0099] L'acide **2,6-bis(hydroxyméthyl)isonicotinique (4)** (50 mg ; 0,273 mmol ; 1 eq) a été dissous dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (3,0 mL), la solution a été

refroidie à 0°C, puis le HATU (156 mg ; 0,410 mmol ; 1,5 eq) et la 2,6-lutidine (147,0 µL ; 1,260 mmol ; 4,7 eq) ont été ajoutés. La solution d'activation a été agitée à 0°C pendant 15 min puis le 6-aminohexanoate de méthyle (59 mg ; 0,322 mmol ; 1,2 eq) a été ajouté. Les parois du ballon ont été rincées avec 2 mL de *N,N*-diméthylformamide anhydre et le milieu réactionnel a été agité à température ambiante pendant 15 h. Le mélange réactionnel a été dilué dans l'acétate d'éthyle, lavé à trois reprises avec une solution saturée de chlorure de sodium, séché sur sulfate de magnésium, filtré et concentré sous pression réduite. Le produit a été purifié par chromatographie flash (dichlorométhane/méthanol, 90:10) pour donner **(5)** (76 mg ; 91%) sous la forme d'un solide blanc cassé.

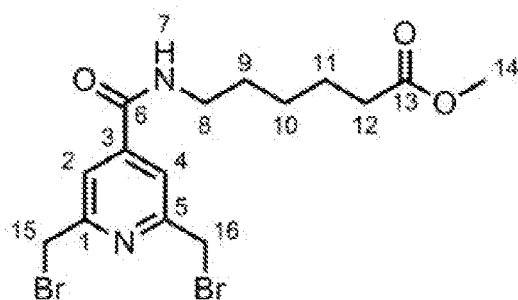
[0100] RMN ¹H (300 MHz, DMSO) δ 8,79 (t ; *J* = 5,6 Hz ; 1H₇) ; 7,71 (s ; 2H_{2,4}) ; 5,50 (t ; *J* = 5,8 Hz ; 2H_{16,18}) ; 4,57 (d ; *J* = 5,8 Hz ; 4H_{15,17}) ; 3,57 (s ; 3H₁₄) ; 3,25 (m ; 2H₈) ; 2,30 (t ; *J* = 7,4 Hz ; 2H₁₂) ; 1,62 – 1,45 (m ; 4H_{9,11}) ; 1,37 – 1,21 (m ; 2H₁₀).

[0101] RMN ¹³C (75 MHz, DMSO) δ 173,3 (1C₁₃) ; 165,1 (1C₆) ; 161,8 (2C_{1,5}) ; 142,9 (1C₃) ; 115,8 (2C_{2,4}) ; 64,1 (2C_{15,17}) ; 51,2 (1C₁₄) ; 38,5 sous le DMSO (1C₈) ; 33,2 (1C₁₂) ; 28,6 (1C₉) ; 25,9 (1C₁₁) ; 24,2 (1C₁₀).

[0102] SMHR(ESI) : masse neutre calculée pour C₁₅H₂₂N₂O₅ [M] : 310,1529 ; observée 310,1526.

[0103] **Préparation du 6-(2,6-bis(bromométhyl)pyridin-4-yl)amidohexanoate de méthyle (6)**

[0104] [Chem.17]



(6)

[0105] Le **6-((2,6-bis(hydroxyméthyl)pyridin-4-yl)amido)hexanoate de méthyle (5)** (55 mg ; 0,177 mmol ; 1 eq) a été mis en suspension dans l'acétonitrile anhydre (10,5 mL) puis le tribromure de phosphore (50 µL ; 0,532 mmol ; 3,0 eq) a été ajouté goutte à goutte. Le milieu réactionnel a été agité à 45 °C pendant 2 h. La solution a été refroidie à 0°C, neutralisée avec de l'eau (10 mL) et extraite à l'acétate d'éthyle (3x15 mL). Les phases organiques combinées ont été lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium, séchées sur sulfate de magnésium et concentrées sous pression réduite. Le produit a été purifié par chromatographie flash (SiO₂, cyclohexane/acétate d'éthyle 60:40) pour donner **(6)** (57 mg ; 74%) sous la forme d'un solide blanc.

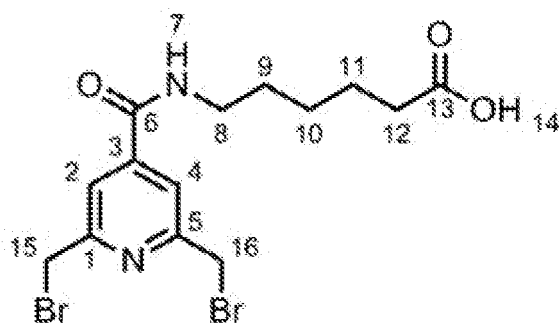
[0106] RMN ^1H (300 MHz ; DMSO) δ 8,83 (t, $J = 5,6$ Hz ; 1H_7) ; 7,84 (s ; $2\text{H}_{2,4}$) ; 4,74 (s ; $4\text{H}_{15,16}$) ; 3,57 (s, 3H_{14}) ; 3,31 – 3,20 (m ; 2H_8) ; 2,31 (t ; $J = 7,4$ Hz ; 2H_{12}) ; 1,64 – 1,45 (m ; $4\text{H}_{9,11}$) ; 1,39 – 1,22 (m, 2H_{10}).

[0107] RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO) δ 173,3 (1C_{13}) ; 163,8 (1C_6) ; 157,5 ($2\text{C}_{1,5}$) ; 144,2 (1C_3) ; 120,8 ($2\text{C}_{2,4}$) ; 51,2 (1C_{14}) ; 38,9 sous le DMSO (1C_8) ; 34,1 ($2\text{C}_{15,16}$) ; 33,2 (1C_{12}) ; 28,5 (1C_9) ; 25,9 (1C_{11}) ; 24,2 (1C_{10}).

[0108] SMHR(ESI) : masse neutre calculée pour $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_3$ [M] : 433,9841 ; observée 433,9832.

[0109] **Préparation de l'acide 6-(2,6-bis(bromométhyl)pyridin-4-yl)amidohexanoïque (7)**

[0110] [Chem.18]



(7)

[0111] Le **6-(2,6-bis(bromométhyl)pyridin-4-yl)amidohexanoate de méthyle (6)** (57 mg ; 0,131 mmol ; 1,0 eq) a été dissous dans le tétrahydrofurane (4 mL) et une solution d'hydroxyde de lithium hydraté (8 mg ; 0,327 mmol ; 2,5 eq) dans l'eau (4 mL) a été ajoutée doucement. Le milieu réactionnel a été agité à température ambiante pendant 8,5 h. Le tétrahydrofurane a été évaporé sous pression réduite et le résidu aqueux a été traité avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1N et extrait avec de l'acétate d'éthyle (3x10 mL). Les phases organiques rassemblées ont été lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium, séchées sur sulfate de magnésium et concentrées sous pression réduite. Le produit a été purifié par chromatographie flash (dichlorométhane/méthanol, 90:10) pour donner **(7)** (44 mg ; 80%) sous la forme d'un solide blanc.

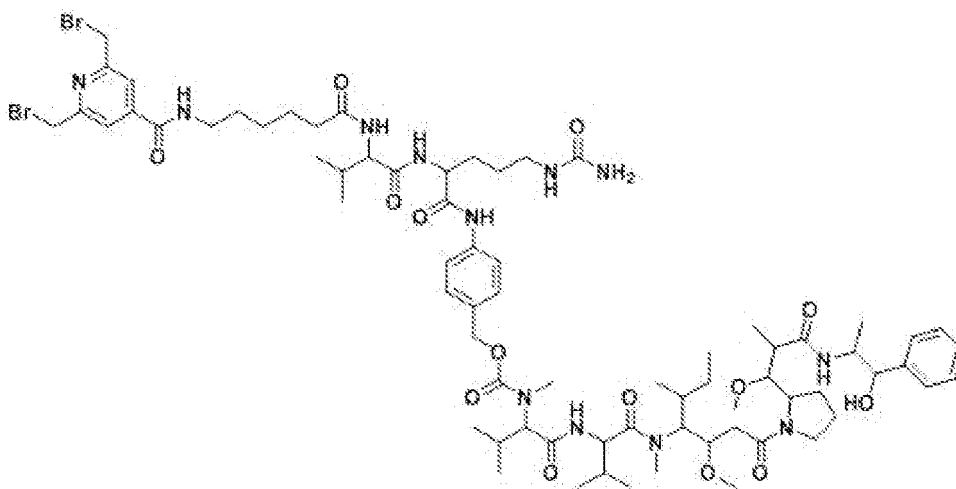
[0112] RMN ^1H (300 MHz ; DMSO) δ 12,00 (s ; 1H_{14}) ; 8,83 (t ; $J = 5,5$ Hz ; 1H_7) ; 7,84 (s ; $2\text{H}_{2,4}$) ; 4,74 (s ; $4\text{H}_{15,17}$) ; 3,31 – 3,21 (m ; 2H_8) ; 2,21 (t ; $J = 7,3$ Hz ; 2H_{12}) ; 1,60 – 1,46 (m ; $4\text{H}_{9,11}$) ; 1,39 – 1,25 (m ; 2H_{10}).

[0113] RMN ^{13}C (75 MHz ; DMSO) δ 174,4 (1C_{13}) ; 163,8 (1C_6) ; 157,5 ($2\text{C}_{1,5}$) ; 144,1 (1C_3) ; 120,8 ($2\text{C}_{2,4}$) ; 39,0 sous le DMSO (1C_8) ; 34,1 ($2\text{C}_{15,16}$) ; 33,6 (1C_{12}) ; 28,6 (1C_9) ; 26,0 (1C_{11}) ; 24,2 (1C_{10}).

[0114] SMHR (ESI) : m/z calculée pour $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_3$ [M+H] $^+$: 420,9757 ; observée 420,9752.

[0115] **Préparation de 6-(2,6-bis(bromométhyl)pyridin-4-yl)amido- *N* - hexanamide-valine-citrulline- *p* -aminobenzoyl carbamate de MMAE (8)**

[Chem.19]



(8)

[0116] Sous atmosphère inerte, dans l'obscurité et en conditions anhydres, l'**acide 6-(2,6-bis(bromométhyl)pyridin-4-yl)amido**hexanoïque (**7**) (13,2 mg ; 0,0313 mmol ; 2,28 eq) a été dissous dans l'acétonitrile anhydre (1,2 mL) puis la *N*-éthoxy-carbonyl-2-éthoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ) (21,2 mg ; 0,0857 mmol ; 6,25 eq) a été ajoutée. Le milieu d'activation a été agité à 25°C pendant 1 h 20. Une solution de sel d'acide trifluoroacétique de valine-citrulline- *p*-aminobenzoyl carbamate de MMAE (17,0 mg ; 0,0137 mmol ; 1,0 eq), solubilisé dans du *N,N*-diméthylformamide anhydre (300 µL) en présence de *N,N*-diisopropyléthylamine (9,4 µL ; 0,0537 mmol ; 3,92 eq), a été ajoutée au milieu d'activation. Le milieu réactionnel obtenu a été agité à 25°C pendant 1 h. Le mélange a été dilué par 2 avec du *N,N*-diméthylformamide et purifié par chromatographie liquide haute pression semi-préparative ($t_R = 22,1$ min ; sur le système Gilson PLC 2050 [ARMEN V2 (pompe) et ECOM TOYDAD600 (détecteur UV)] détection UV à 254 nm à 25 °C ; colonne Waters XBridge™ C-18 ; 5 µm (250 mm x 19,00 mm) ; élution réalisée avec 0,1 % d'acide trifluoroacétique (en volume) dans l'eau (solvant A), et de l'acétonitrile (solvant B) ; gradient 20 à 100% de B sur 32 min puis 100% de B sur 6 min à 17,1 mL/min) pour donner (**8**) (18,2 mg ; 87%) sous la forme d'un solide blanc.

[0117] RMN ^1H (300 MHz, DMSO) δ (ppm) 10,04 – 9,95 (m ; 1H) ; 8,94 – 8,79 (m ; 1H) ; 8,20 – 8,06 (m ; 2H) ; 7,98 – 7,87 (m ; 1H) ; 7,84 (s ; 2H) ; 7,81 (s ; 1H) ; 7,70 – 7,61 (m ; 1H) ; 7,58 (d ; $J = 8,2$ Hz ; 2H) ; 7,38 – 7,11 (m ; 6H) ; 6,07 – 5,92 (m ; 1H) ; 5,47 – 5,37 (m ; 1H) ; 5,15 – 4,96 (m ; 1H) ; 4,73 (s ; 4H) ; 4,54 – 4,29 (m ; 2H) ; 4,32 – 4,12 (m ; 1H) ; 4,05 – 3,92 (m ; 1H) ; 3,30 – 3,08 (m ; 9H) ; 3,06 – 2,93 (m ; 2H) ; 2,91 – 2,77 (m ; 2H) ; 2,24 – 2,05 (m ; 2H) ; 2,21 – 2,11 (m ; 3H) ; 2,02 – 1,88 (m ; 1H) ;

1,60 – 1,44 (m ; 5H) ; 1,36 – 1,13 (m ; 4H) ; 1,08 – 0,93 (m ; 6H) ; 0,93 – 0,67 (m ; 28H).

[0118] SMHR (ESI) : m/z calculée pour $C_{72}H_{111}Br_2N_{12}O_{14}$ $[M+H]^+$: 1525,6704 ; observée 1525,6700.

[0119] **Exemple 2 : synthèse d'un conjugué anticorps-médicament selon l'invention**

[0120] Code du produit synthétisé : MF-m906-MMAE (correspondant à la formule (Ia), également appelé ci-après « conjugué anticorps-médicament selon l'invention » ou de manière générale « ADC »).

[0121] Anticorps utilisé pour produire le conjugué anticorps-médicament selon l'invention : m906.

[0122] **Préparation des solutions**

[0123] Tampon de bioconjugaison : Tampon salin 1X, par exemple phosphate, borate, acétate, glycine, tris(hydroxyméthyl)aminométhane, acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazineéthanesulfonique dans une plage de pH comprise entre 6 et 9, avec une concentration finale en NaCl comprise entre 50 et 300 mM et une concentration finale en EDTA comprise entre 0,1 et 10 mM.

[0124] m906 à une concentration comprise entre 1 et 10 mg/mL dans le tampon de bioconjugaison.

[0125] Réducteur : Solution d'un réducteur choisi parmi le dithiotréitol, le β -mercaptoéthanol, l'hydrochlorure de tris(2-carboxyéthyl)phosphine, la tris(hydroxypropyl)phosphine à une concentration comprise entre 0,1 et 10 mM dans le tampon de bioconjugaison.

[0126] Solution de linker : composé **8** à une concentration comprise entre 0,1 et 10 mM dans un mélange de solvants organiques choisis parmi le diméthylsulfoxyde, le *N,N*-diméthylformamide, le méthanol, le tétrahydrofurane, l'acétonitrile, le *N,N*-diméthylacétamide, le dioxane.

[0127] **Réaction de bioconjugaison**

[0128] Sous atmosphère inerte, au m906 dans le tampon bioconjugaison (1 mg ; 1 éq) a été ajouté le réducteur (4 à 100 éq) puis le tout a été incubé entre 15 et 40 °C pendant 0,25 à 3 h puis la solution de composé **8** (4 à 100 éq) a été ajoutée sous atmosphère inerte et le milieu réactionnel a été agité entre 15 et 40 °C pendant 0,5 à 15 h. Cette réaction a été dupliquée, en parallèle, autant de fois que nécessaire pour obtenir la quantité d'ADC final souhaitée, i.e. 18 fois.

[0129] **Purification de l'ADC**

[0130] Le mélange réactionnel a été purifié sur PD-10 (GE Healthcare) avec du tampon PBS Gibco pH 7,4 le nombre de fois nécessaire pour éliminer les réactifs chimiques résiduels, i.e. purifié 3 fois.

[0131] *Résultat*

[0132] Les étapes décrites ci-dessus ont permis d'obtenir 12,87 mg de MF-m906-MMAE (71%).

[0133] **Exemple 3 : analyses du conjugué anticorps-médicament (MF-m906-MMAE)**

[0134] **Analyse HIC (Hydrophobic Interaction Chromatography)**

[0135] *Matériel et méthode*

[0136] L'ADC MF-m906-MMAE a été dilué à 1 mg/mL avec du PBS pH 7,4 avant d'être filtré sur 0,22 µm. 50 µg de produits ont été injectés sur une colonne MAbPac HIC-Butyl, 5 µm, 4,6 x 100 mm (ThermoScientific), connectée à une chaîne HPLC Waters Alliance (e2695) équipée d'un PDA (e2998) réglé pour une détection à 280 nm. L'ADC MF-m906-MMAE a été élué à un débit de 1 mL/min par un gradient depuis 100% de tampon A (1,5 M sulfate d'ammonium, 50 mM phosphate de sodium monobasique, 5% isopropanol (v/v), pH 7,0) jusqu'à 20% de tampon B (50 mM phosphate de sodium monobasique, 20% isopropanol (v/v), pH 7,0) en 2 minutes puis jusqu'à 85% de tampon B dans le tampon A en 30 minutes puis ce gradient a été maintenu pendant 1 min. La température a été maintenue à 25 °C tout au long de la séparation.

[0137] Les résultats obtenus pour MF-m906-MMAE sont présentés en Figure 1, et dans le **Tableau 1** ci-dessous.

[0138] [Tableaux1]

MF-m906-MMAE	DAR 0	DAR 1	DAR 2	DAR 3	DAR 4	DAR 5
Temps de rétention (min)	8,65	10,87	12,39	18,36	21,47	25,9
Aire (%)	0,39	0,09	5,45	16,20	59,69	18,17
DAR moyen	3,89					

[0139] **Analyse SEC (Size Exclusion Chromatography)**

[0140] *Matériel et méthode*

[0141] L'ADC MF-m906-MMAE a été dilué à 1 mg/mL avec du PBS pH 7,4 avant d'être filtré sur 0,22 µm. 50 µg de produits ont été injectés sur une colonne AdvanceBio SEC 2.7 µm, 7,8 x 300 mm (Agilent Technologies), connectée à une chaîne HPLC Waters Alliance (e2695) équipée d'un PDA (2998) réglé pour une détection à 280 nm. L'ADC MF-m906-MMAE a été élué à un débit de 1 mL/min par un isocratique de tampon C (1 mM phosphate de sodium monobasique, 155 mM de chlorure de sodium, 3 mM de phosphate de sodium dibasique, 3 mM d'azotate de sodium, pH 7,0) en 24 minutes. La température a été maintenue à 25 °C tout au long de la séparation.

[0142] Les résultats sont présentés à la Figure 2 et dans le Tableau 2 ci-dessous.

[0143] [Tableaux2]

MF-m906-MMAE	Agrégats	Monomères
Temps de rétention (min)	4,862	8,253
Aire (%)	0,64	99,36

[0144] Analyse MS native (native Mass Spectrometry)[0145] *Matériel et méthode*

[0146] L'analyse spectrométrique de masse a été réalisée sur un spectromètre de masse Vion IMS Qtof couplé à un système Acquity UPLC H-Class de Waters (Wilmslow, UK). Avant l'analyse MS, les échantillons (20 ug) ont été dessalés sur une colonne de dessalage BEH SEC 2,1 x 150 mm 300 Å par un gradient isocratique (50 mM d'acétate d'ammonium, pH 6,5) à 40 µL/min. Une vanne de dérivation a été programmée pour permettre au solvant d'entrer dans le spectromètre entre 6,5 et 9,5 min seulement. Les données MS ont été acquises en mode positif avec une source ESI sur une gamme m/z de 500 à 8000 à 1 Hz et analysées en utilisant le logiciel UNIFI 1.9 et l'algorithme MaxEnt pour la déconvolution.

[0147] Les résultats sont présentés à la Figure 3 et dans le Tableau 3 ci-dessous.

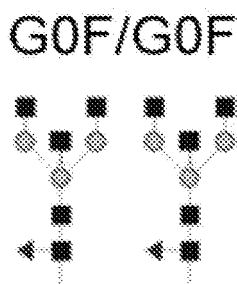
[0148] [Tableaux3]

MF-m906-MMAE	DAR 0	DAR 1	DAR 2	DAR 3	DAR 4	DAR 5
MW (Da) ¹	n.o. ²	n.o. ²	152572	153945	155315	156686
Aire (%)	0	0	0,7	17,0	74,5	7,7
DAR moyen	3,89					

1 : glycosylation G0F/G0F

2 : n.o. = non observé

[Chem.20]



[0149] **Exemple 4 : évaluation *in vitro* du conjugué anticorps-médicament MF-m906-MMAE**

[0150] 4.1. Reconnaissance des cellules tumorales par le m906 : carcinome à cellules de

Merkel

[0151] **Immunohistochimie sur tumeurs de patients**

[0152] *Matériel et méthode*

[0153] Le marquage immunohistochimique avec un anticorps commercial anti-CD56 (123C3, Ventana, Prediluted) a été réalisé sur une cohorte de 90 tumeurs CCM incluses dans un tissu micro array en utilisant une plate-forme benchMark XT en suivant les instructions du fournisseur. L'expression du CD56 a été évaluée par un homme du métier en utilisant le score semi-quantitatif suivant : 0 : absence d'expression, 1 : positivité faible et/ou hétérogène ; 2 : positivité intense et diffuse.

[0154] *Résultats* : De manière générale, 66% des cas étaient positifs (n = 59) avec une expression intense et diffuse (score 2) détectée dans 37% des cas (n = 33).

[0155] **Cytométrie en flux et Immunohistochimie sur les lignées de CCM**

[0156] *Matériel et méthode*

[0157] Pour évaluer l'expression du CD56 par les lignées cellulaires, les cellules tumorales ont été incubées en présence d'un anticorps anti-CD56 couplé au FITC (BioLegend , clone : HCD56) ou de l'isotype contrôle selon les indications fournies par le fabricant. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois en PBS + 1% de sérum de veau fœtal puis analysées.

[0158] Pour l'évaluation de la fixation du m906 et du trastuzumab (anticorps anti-HER2 contrôle) sur les cellules tumorales, des marquages immunocytochimiques ont été effectués avec l'anticorps m906 utilisé à 650 ng/ml, ou l'anticorps trastuzumab (Herceptin 150 mg Roche) à 40 ng/ml puis révélés à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase.

[0159] **Lignées cellulaires testées**

[0160] WaGa (RRID:CVCL_E998).

[0161] MS-1 (RRID:CVCL_E995).

[0162] PeTa (RRID:CVCL_LC73).

[0163] MKL-2 (RRID:CVCL_D027).

[0164] *Résultats* :

[0165] Les cellules WaGa, MS-1, PeTa et MKL-2 sont des lignées cellulaires de carcinome à cellules de Merkel (ci-après CCM). Toutes les lignées ci-dessus sont CD56-positives (Figure 4).

[0166] SK-BR-3 (RRID :CVCL_0033) : lignée de cancer du sein HER2-positive, choisie comme contrôle car n'exprime pas le CD56.

[0167] Les fixations du m906 et du trastuzumab (TTZ), inclus comme contrôle, ont été testées sur les lignées par étude immunohistochimique. Cette analyse montrait une fixation du m906 sur l'ensemble des lignées de CCM alors qu'il n'était pas observé de fixation avec le TTZ (Tableau 4 : confirmation de la fixation du m906 sur les lignées

de CCM).

[0168] [Tableaux4]

Lignée cellulaire	WaGa	MS-1	PeTa	MKL-2	SKBR3
Fixation du m906	+	+	+	+	-
Fixation du Trastuzumab	-	-	-	-	+

+ : présence d'une fixation de l'anticorps à la cellule cible révélée par la peroxydase, - absence de fixation

[0169] **Cytométrie de flux d'imagerie - m906 et coloration de compartiment intracellulaire et acquisition d'image**

[0170] *Matériel et méthode*

[0171] Pour confirmer son internalisation dans les cellules tumorales, l'anticorps m906 a été conjugué avec l'Alexa Fluor 750 en utilisant le kit "SAIVI Rapid Antibody Labeling Kit" (Thermoscientific) selon les instructions données par le fabricant. Les cellules WaGa (500 000 cellules) ont été incubées pendant 30 min à température ambiante avec le conjugué m906-Alexa Fluor 750 dans une solution tampon (PBS 1X, 2% sérum de veau fœtal, 0,1% d'azide de sodium). Les cellules ont ensuite été fixées à l'aide du BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences) et perméabilisées avec du Permwash (BD Biosciences, dilué à 1/10e) selon les instructions du fabricant. Les compartiments nucléaire et lysosomal ont été marqués par le Hoechst 33342 (BD Pharmingen, 1/10000) et un anticorps anti-LAMP1 couplé à la phycoerythrin-Cyanine 5 (BD Pharmingen, H4A3), respectivement. L'analyse des cellules marquées a été réalisée à l'aide d'un cytomètre imageur en flux Amnis® ImageStream®X Mark II (Amnis Corp., une partie d'EMD Millipore, Seattle, WA) équipé de 4 lasers (375 nm, 488 nm, 642 nm et 785 nm (SSC)). Les images des WaGa ont été capturées avec le logiciel de cytométrie de flux d'imagerie Inspire™ au grossissement 60X et avec une profondeur de champ étendue (EDF).

[0172] Des compensations ont été réalisées avant chaque analyse. Les cellules d'intérêt ont été identifiées en utilisant l'outil « Gradient RMS » de l'image Bright Field (BF : lumière blanche). Les débris et les doublets cellulaires ont été exclus de l'analyse en fonction du rapport d'aspect par rapport à la parcelle de zone de l'image BF. La surface et l'intensité moyenne de fluorescence intracellulaire (IMF) du m906 conjugué à l'Alexa Fluor 750 (canal 12) a été évaluée pour deux temps d'incubation différents (5 et 30 min) à l'aide des outils « surface mask » et « cytoplasm mask » avec le logiciel

IDEAS® v6.2. Le score d'internalisation du m906 conjugué à l'Alexa Fluor 750 (canal 12) a été déterminé en utilisant la fonction d'internalisation permettant de définir le rapport de l'intensité de fluorescence intracellulaire sur l'intensité des cellules entières. Les cellules avec anticorps internalisés ont des scores positifs. L'assistant de co-localisation utilisant la fonction de « similitude de détail lumineux » (BDS) a été employé pour quantifier le niveau de colocalisation entre l'anticorps anti-LAMP1 conjugué à la phycoerythrine-Cyanine 5 (canal 5) et le m906 conjugué à l'Alexa Fluor 750 (canal 12). Le score positif de BDS (n. 1) indique la localisation lysosomale du m906.

[0173] *Résultats*

[0174] Le m906 anticorps anti-CD56 est internalisé dans le lysosome dans les cellules WaGa exprimant le CD56 (Tableau 5). C'est une étape cruciale pour la libération de drogues par un ADC, ce qui fait du m906 un bon candidat anticorps pour le développement d'un ADC.

[0175] [Tableaux5]

Durée d'incubation (minutes)	Nombre de cellules dans le focus	Surface de fluorescence m906 (MFI*¹)	Fluorescence Intracellulaire du m906 (MFI*¹)	Score d'internalisation du m906	Score BDS*² (LAMP1/m906)
5	8617	930	50046	7.08	1.4
30	5223	580	50464	7.96	1.4

*¹ Mean Fluorescence Intensity

*² Bright Detail Similarity

[0176] 4.2. Cytotoxicité de MF-m906-MMAE sur les lignées *in vitro*

[0177] **Evaluation de la viabilité (test de prolifération)**

[0178] *Matériel et méthode*

[0179] Pour évaluer la viabilité cellulaire, un test de cytotoxicité par le XTT a été réalisé. Les cellules ont été déposées en 7 répliques dans une plaque 96 puits (50 000 cellules/puits). Les ADCs MF-m906-MMAE et MF-TTZ-MMAE (ADC contrôle) ont été ajoutés en concentrations incrémentielles. Le milieu de culture a servi de contrôle négatif. Après 4 jours d'exposition à la drogue, 25 µl de réactif XTT ont été ajoutés par puits et l'absorption a été mesurée à 450 nm après 4 heures d'incubation à 37 °C. L'absorption à 620 nm a été utilisée comme référence.

[0180] *Résultats*

[0181] L'évaluation de la cytotoxicité sur lignées cellulaires a montré que l'ADC MF-

m906-MMAE est aussi cytotoxique que la MMAE libre (IC₅₀ entre 1-10 nM) pour toutes les lignées de CCM. Par ailleurs, ni l'anticorps m906 (*i.e.* non couplé à MMAE), ni l'ADC MF-TTZ-MMAE (ADC contrôle) n'ont d'effet cytotoxique sur ces mêmes lignées aux plus faibles concentrations efficaces testées démontrant l'absence de toxicité intrinsèque de la construction (Figure 5).

[0182] 4.3. Confirmation de la spécificité du m906 : L'effet cytotoxique observé est dépendant de CD56 (Figure 6)

[0183] **Plasmides et transduction lentivirale**

[0184] *Matériel et méthode*

[0185] Trois shRNA ciblant la séquence du CD56 ont été générés (séquences obtenues à partir du Consortium RNAi (A : TRCN0000373085 (SEQ ID NO 9-10) / B : TRCN0000373034 (SEQ ID NO°11-12) / C : TRCN0000073460 (SEQ ID NO°13-14)) et clonés dans un vecteur lentiviral FH1tUTG comme décrit précédemment [5]. À noter, dans cette construction, l'activité du promoteur contrôlant la transcription des séquences de shRNA est inductible par la doxycycline. Les surnageants lentiviraux ont été produits dans les cellules HEK293T (RRID:CVCL_0063) comme précédemment décrit [6-7]. Le surnageant récolté a été stérilisé par filtration (0,45 µm) et du polybrène a été ajouté (1 µg/ml) avant l'infection. Après 14-20 h d'incubation avec les surnageants contenant les lentivirus, les cellules cibles ont été lavées puis soumises à une sélection antibiotique (puromycine). Pour l'invalidation de l'expression du CD56 dans les lignées tumorales (knock-down), les cellules ont été exposées à la doxycycline pendant 7 jours avant analyse.

[0186] *Résultats*

[0187] La cytotoxicité induite par MF-m906-MMAE a été largement réduite lors du knock-down du CD56 et ce pour les trois shRNAs (Figure 6) confirmant que la reconnaissance du CD56 par le m906 est essentielle pour induire une cytotoxicité de MF-m906-MMAE.

[0188] **Exemple 5 : évaluation *in vivo* du conjugué anticorps-médicament (MF-m906-MMAE)**

[0189] Performances thérapeutiques du m906 dans un modèle de xénogreffe de lignées cellulaires de CCM sur souris NOD/SCID

[0190] *Matériel et méthode*

[0191] **Modèle de souris**

[0192] Vingt souris femelles NOD/SCID (Janvier Labs) de 7 semaines ont été maintenues dans des conditions aseptiques. Toutes les procédures relatives aux animaux ont été approuvées par le comité d'éthique local (Apafis-10076-2017053015488124 v4). La lignée cellulaire de CCM CD56-positif « WaGa » [8] a été utilisée pour l'induction tumorale. Les souris anesthésiées par l'isoflurane ont reçu une injection sous-cutanée

de 10^7 cellules dans du Matrigel (site d'injection : dos). La taille de la tumeur déterminée en mesurant la largeur, la longueur et la hauteur avec un pied à coulisse et l'état général de l'animal ont été surveillés tous les 2 jours pendant toute la durée de la procédure. Le volume de tumeur a été déterminé avec la formule suivante largeur x longueur x hauteur x $\pi/6$. Quand le volume de la tumeur a atteint 50 mm³, les souris ont été incluses dans l'étude et aléatoirement assignées aux groupes expérimentaux ou contrôle.

[0193] **Procédure expérimentale**

[0194] Après inclusion, les animaux ont reçu une injection intraveineuse d'ADC (soit MF-m906-MMAE, soit MF-TTZ-MMAE, 10 mg/kg) ou l'injection en volume équivalent de PBS pour les souris contrôles. Une nouvelle injection a été exécutée en cas de doublement du volume de la tumeur dans le groupe expérimental. Les souris ont été sacrifiées 30 jours après l'inclusion ou en cas d'atteinte d'un point critique (ulcération tumorale, perte de poids de 20 % ou prostration). Une autopsie des animaux a été réalisée et l'ensemble des organes a été examiné macroscopiquement par un pathologiste. Le poids et le volume des tumeurs ont été évalués après dissection. L'examen microscopique des tumeurs, des poumons et du foie a été réalisé pour détecter une potentielle progression métastatique.

[0195] **Analyse statistique**

[0196] Des données continues sont décrites en moyennes et limites. Les données catégorielles sont décrites en nombre et pourcentage de cas interprétables. Les associations ont été évaluées par le test exact de Fisher pour les données catégorielles ou par les tests Mann-Whitney ou Kruskal Wallis pour les données continues. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel XLStat (Addinsoft, Paris, France). $p < 0,05$ a été considéré comme statistiquement significatif.

[0197] **Résultats**

[0198] MF-m906-MMAE a réduit la croissance tumorale dans un modèle murin de xé-nogreffe de lignées cellulaires de MCC.

Les résultats de l'administration d'une triple dose de 10 mg/kg de MF-m906-MMAE, MF-TTZ-MMAE ou PBS sont présentés en Figure 7 (volumes tumoraux relatifs) et Figure 8 (masse tumorale en fin d'étude). Dans les deux derniers groupes, utilisés comme contrôles, une croissance tumorale similaire a été observée, avec un coefficient moyen de pente de la courbe de croissance de 105 % du volume tumoral initial par jour (limites 35-166) et 108 % du volume tumoral initial par jour (limites 33-318) pour le groupe PBS et MF-TTZ-MMAE, respectivement). Pour le groupe expérimental, traité avec MF-m906-MMAE, la croissance tumorale a été significativement retardée (coefficient moyen de pente de la courbe de croissance de 18 % du volume tumoral initial par jour (limites 1-53); Test de Kruskal Wallis : $p = 0,01$). En conséquence, le

poids médian final des tumeurs a été réduit dans le groupe traité par MF-m906-MMAE comparé aux animaux témoins (Figure 8) (poids moyen 0,7g (bornes : 0,4-1.3) contre 2,03g (bornes : 1,3-3,7) et 1,78g (bornes : 1-2,7), test de Kruskal Wallis : p-0.02). Après le sacrifice, aucune métastase n'a été observée dans le groupe expérimental ni dans les groupes contrôles. Aucun signe de toxicité de MF-m906-MMAE n'a été observé sur les tissus non tumoraux prélevés lors de l'autopsie.

[0199] **Listage de séquences**

[0200]

[Tableaux6]

Numéro de séquence	Type de séquences	Séquence en acides aminés
SEQ ID NO : 1	CDR1 de la chaîne légère du m906	QSLHLSNGYN
SEQ ID NO : 2	CDR2 de la chaîne légère du m906	YLG
SEQ ID NO : 3	CDR3 de la chaîne légère du m906	CMQSLQTPWT
SEQ ID NO : 4	CDR1 de la chaîne lourde du m906	GGTFTGYMHW
SEQ ID NO : 5	CDR2 de la chaîne lourde du m906	NSGGTNYAQ
SEQ ID NO : 6	CDR3 de la chaîne lourde du m906	LSSGYSGYFDYWGG
SEQ ID NO : 7	Chaîne légère du m906	DVVMTQSPLSLPVTGPASISCRSSQSLHLSNGYNFLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEADDDVGVYYCMQSLQTPWTFGHGTHKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO : 8	Chaîne lourde du m906	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDLSSGYSGYFDYWGGQGLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV

		VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
SEQ ID NO : 9	RNAi TRCN0000373085 Forward	TCCCAGCGTTGGAGAGTCCAA ATTCTCGAGAATTTGGACTCTC CAACGCTTTTTTCGGG
SEQ ID NO : 10	RNAi TRCN0000373085 Reverse	AAAAAAGCGTTGGAGAGTCCA AATTCTCGAGAATTTGGACTCT CCAACGCT
SEQ ID NO : 11	RNAi TRCN0000373034 Forward	TCCCCGTTCCCTGAAACCGTTA AACTCGAGTTTAACGGTTTCAG GGAACGTTTTT
SEQ ID NO : 12	RNAi TRCN0000373034 Reverse	CGGGAAAAACGTTCCCTGAAA CCGTTAAACTCGAGTTTAACGG TTTCAGGGAACG
SEQ ID NO : 13	RNAi TRCN0000073460 Forward	TCCCATGTACCTTGAAGTGCA ATCTCGAGATTGCACTTCAAGG TACATGTTTTT
SEQ ID NO : 14	RNAi TRCN0000073460 Reverse	CGGGAAAAACATGTACCTTGA AGTGCAATCTCGAGATTGCACT TCAAGGTACATG
SEQ ID NO : 15	Domaine variable de la chaîne légère du m906	DVVMTQSPLSLPVTGPGEPAIS RSSQSLLHSNGYNFLDWYLQKP GQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEADDTGV YYCMQSLQTPWTFGHGKVEIK

		R
SEQ ID NO : 16	Domaine variable de la chaîne lourde du m906	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFTGYIMHWVRQAPGQ GLEWMGWINPNSGGTNYAQKF QGRVTMTRDTSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCARDLSSGYSGYF DYWGQGTLVTVS

[0201] **Références citées sous le format « [numéro de référence] » :**

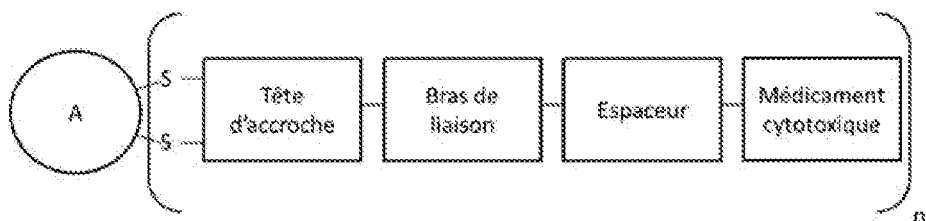
1. Feng, Y. *et al.*, *MAbs*, May-Jun; 8(4): 799-810, 2016
2. Goyon, A *et al.*, *J. Chromatogr. B*, 1065–1066, 35-43, 2017
3. Fekete, S. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 130, 3–18, 2016
4. Barran, P. *et al.*, *EuPA Open Proteomics*, 11, 23-27, 2016
5. Houben, R.. *et al.*, *International journal of Cancer*, 130, 847-856, 2012
6. Angermeyer S. *et al.*, *J. Invest. Dermatol.*, 133(8):2059–2064, 2013
7. Aragaki M. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 368(4):923–929, 2008
8. Houben R, *et al.*, *J. Virol.*;84(14):7064–7072, 2010

Revendications

[Revendication 1]

Conjugué anticorps-médicament de formule (I) suivante :

[Chem. 1]

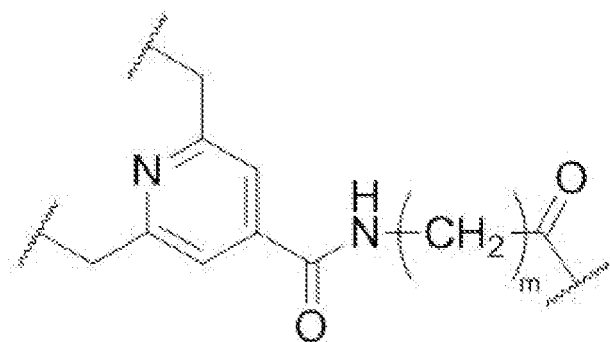


dans laquelle :

A est un anticorps ou un fragment d'anticorps anti-CD56 ;

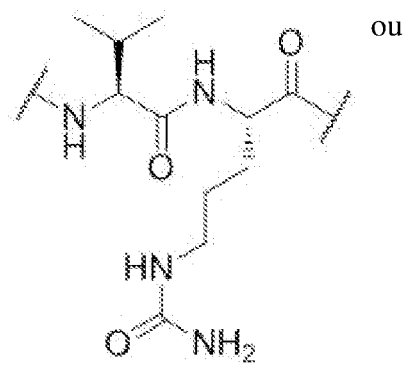
la tête d'accroche est représentée par la formule suivante :

[Chem. 2]

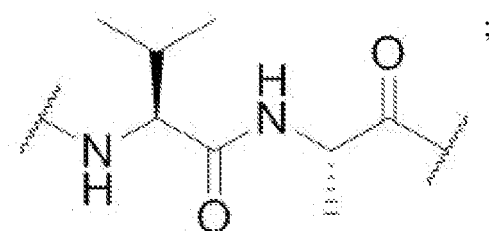


le bras de liaison est un bras de liaison clivable représenté par la formule suivante :

[Chem. 3]

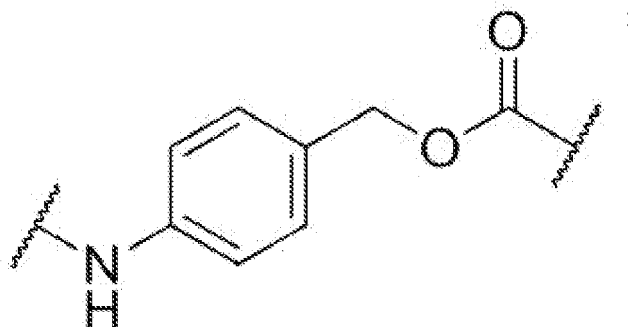


[Chem. 4]



l'espaceur est représenté par la formule suivante :

[Chem. 5]



m est un entier allant de 1 à 10 ;

n est un entier allant de 1 à 4.

[Revendication 2]

Conjugué anticorps-médicament selon la revendication 5, dans lequel m est égal à 5.

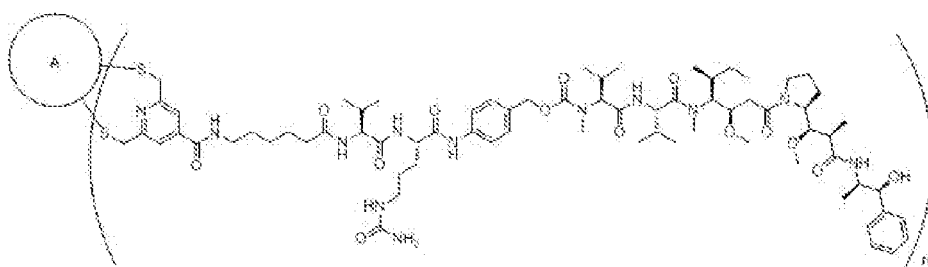
[Revendication 3]

Conjugué anticorps-médicament selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, dans lequel le médicament cytotoxique est choisi parmi méthotrexate, IMiDs, duocarmycin, combretastatine, calicheamicine, monométhylauristatine E (MMAE), monométhylauristatine F (MMAF), maytansine, DM1, DM4, SN38, amanitine, pyrrolobenzodiazepine, dimère de pyrrolobenzodiazepine, pyrrolopyridodiazepine, dimère de pyrrolopyridodiazepine, un inhibiteur de l'histone désacétylase, un inhibiteur de tyrosine kinase, et ricine, de préférence MMAE.

[Revendication 4]

Conjugué anticorps-médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 de formule suivante :

[Chem. 10]



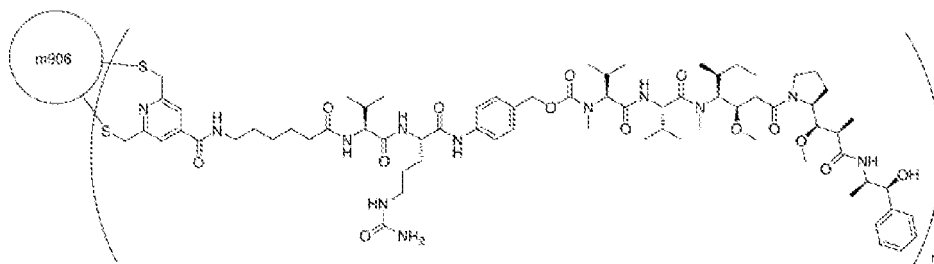
[Revendication 5]

Conjugué anticorps-médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel A est m906.

[Revendication 6]

Conjugué anticorps-médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 de formule (Ia) suivante :

[Chem. 11]

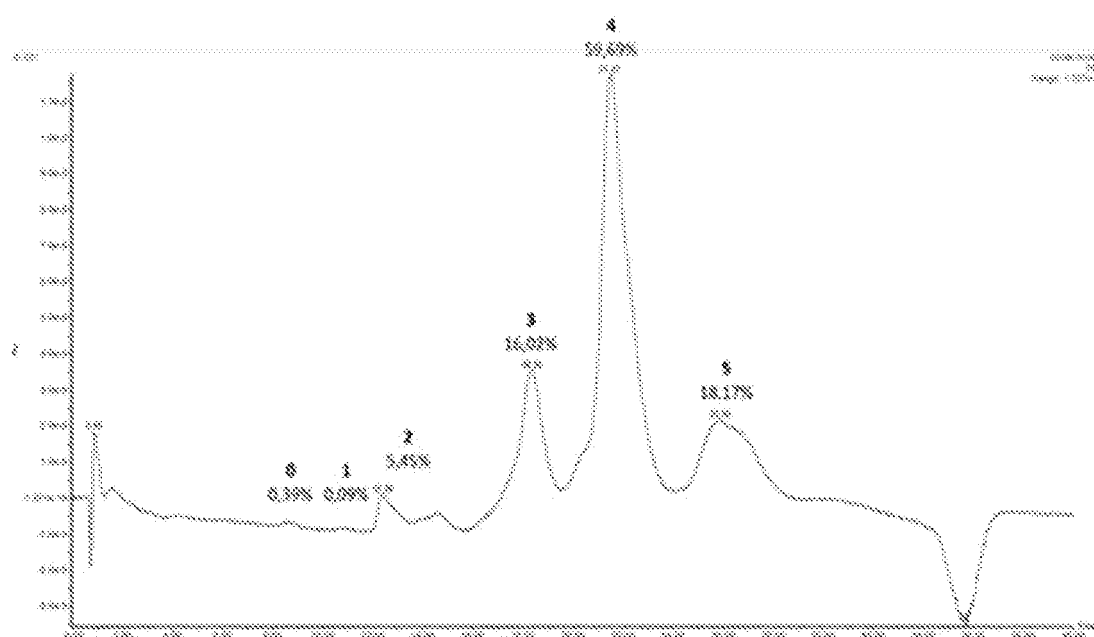


- [Revendication 7] Composition comprenant un ou plusieurs conjugué(s) anticorps-médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.
- [Revendication 8] Composition selon la revendication 7, dans laquelle au moins 50%, de préférence environ 60%, des conjugués anticorps-médicament ont un n égal à 4.
- [Revendication 9] Composition selon l'une quelconque des revendications 7 ou 8, dans laquelle A est un anticorps et le Drug-to-Antibody Ratio moyen (DAR moyen) est compris entre 3,5 et 4, de préférence compris entre 3,8 et 4, par exemple égal à $3,9 \pm 0,1$.
- [Revendication 10] Composition selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, comprenant en outre du paclitaxel, du docétaxel, de la doxorubicine et/ou du cyclophosphamide, du lenalidomide, de la dexaméthasone, du carboplatine, de l'étoposide et/ou un anticorps utilisé en immunothérapie anti-cancéreuse tel qu'un anti-PD1 ou un anti-PD-L1.
- [Revendication 11] Conjugué anticorps-médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour utilisation comme médicament.
- [Revendication 12] Conjugué anticorps-médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour utilisation dans le traitement d'un cancer CD56+, de préférence le mélanome, les tumeurs de blastème, les hémopathies, telles que les leucémies aiguës myéloïdes, les myélomes, les néoplasies à cellules dendritiques plasmacytoïdes blastiques et les carcinomes neuroendocrines.
- [Revendication 13] Conjugué anticorps-médicament pour utilisation selon la revendication 12, dans lequel le cancer CD56+ est choisi parmi les carcinomes neuroendocrines, tel que le carcinome à petites cellules du poumon ou le carcinome à cellules de Merkel, de préférence le carcinome à cellules de Merkel.
- [Revendication 14] Composition selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, pour utilisation comme médicament.
- [Revendication 15] Composition selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, pour utilisation dans le traitement d'un cancer CD56+, de préférence le mélanome, les tumeurs de blastème, les hémopathies, telles que les

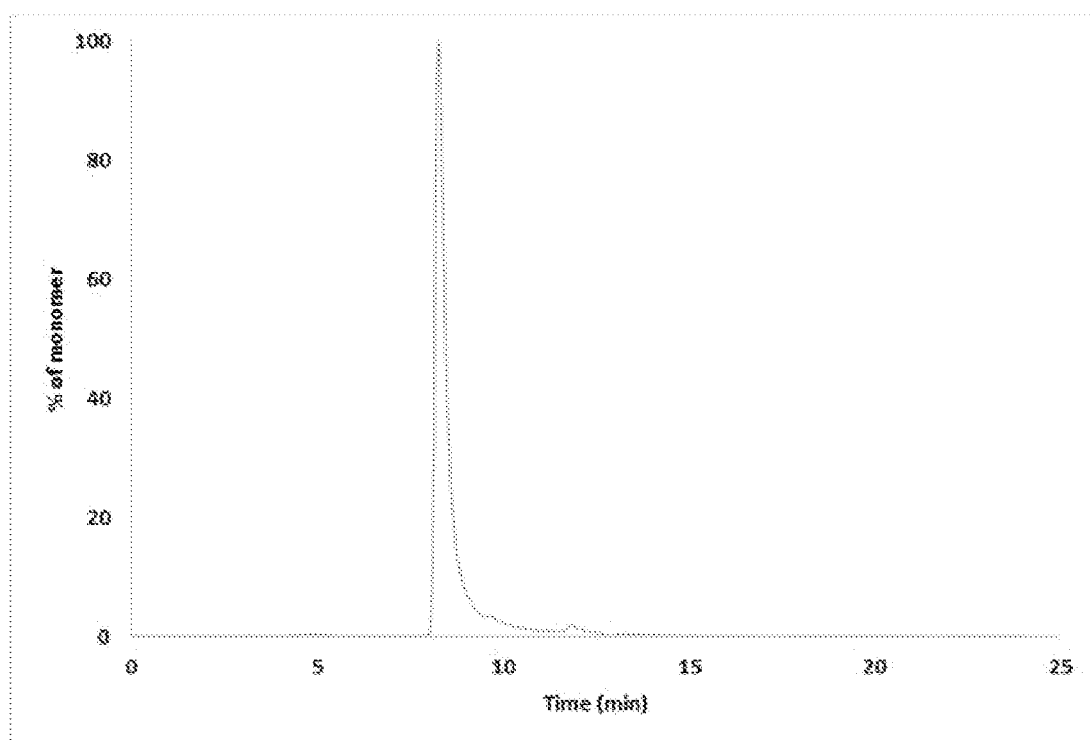
leucémies aiguës myéloïdes, les myélomes, les néoplasies à cellules dendritiques plasmacytoïdes blastiques et les carcinomes neuroendocrines.

[Revendication 16] Composition pour utilisation selon la revendication 15, dans lequel le cancer CD56+ est choisi parmi les carcinomes neuroendocrines, tel que le carcinome à petites cellules du poumon ou le carcinome à cellules de Merkel, de préférence le carcinome à cellules de Merkel.

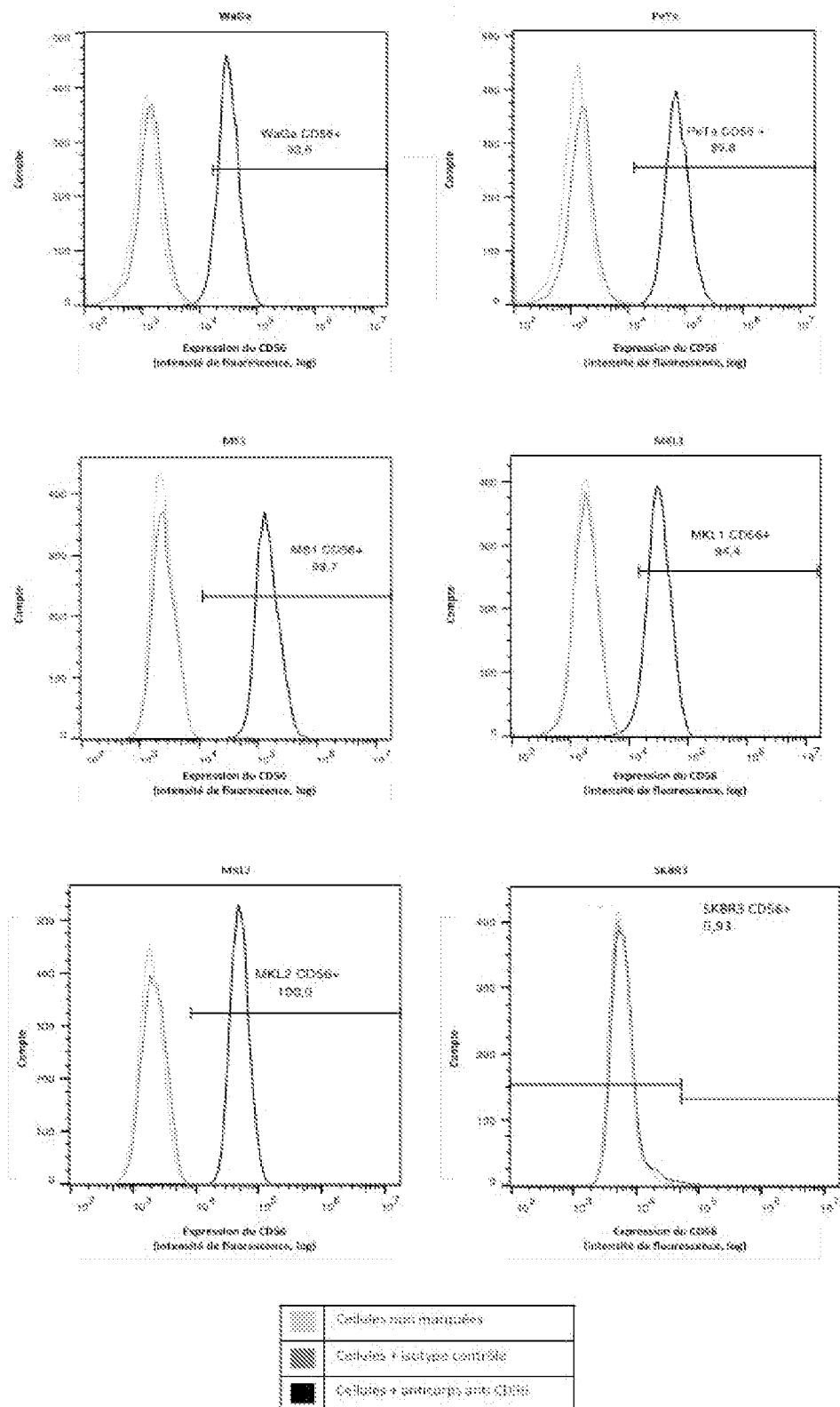
[Fig. 1]



[Fig. 2]

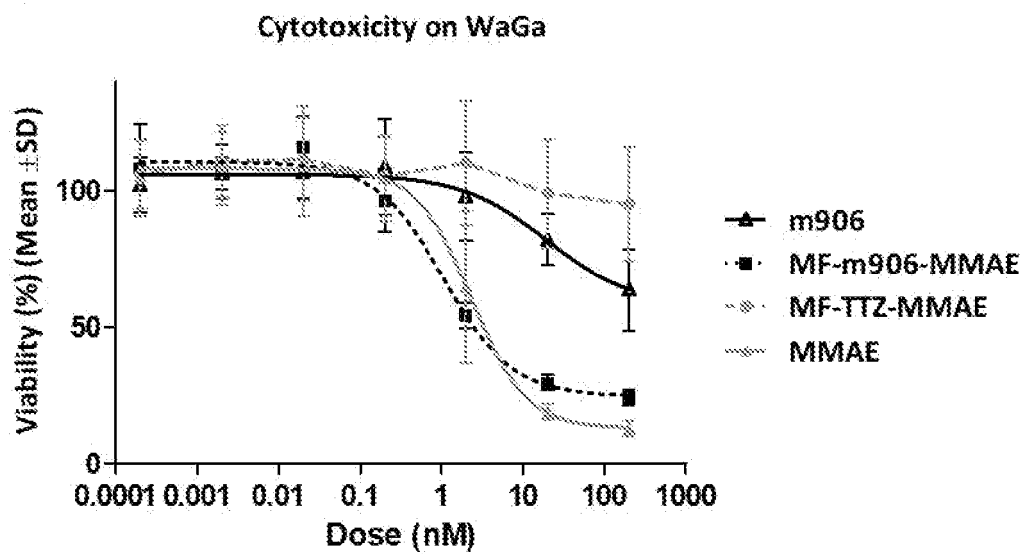


[Fig. 4]



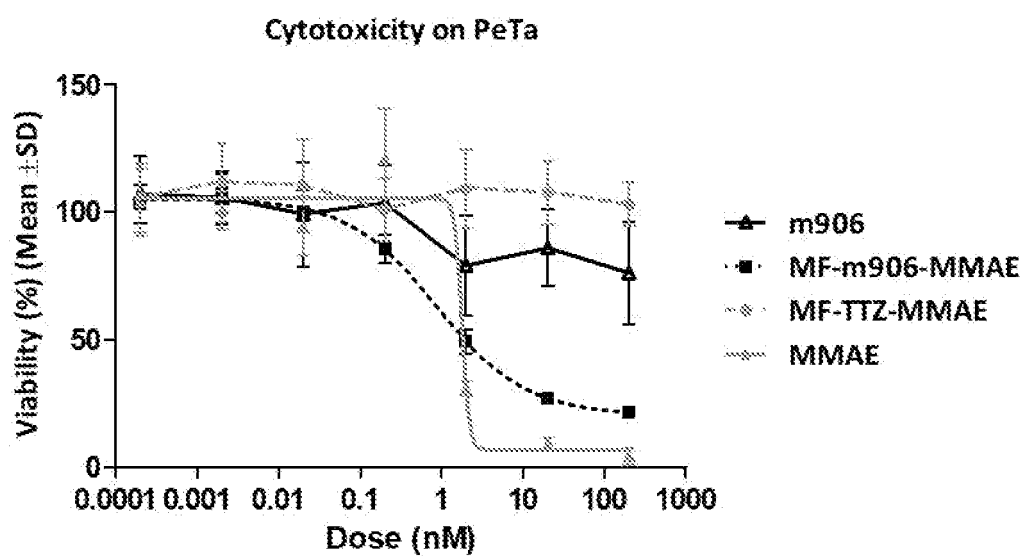
[Fig. 5A]

A



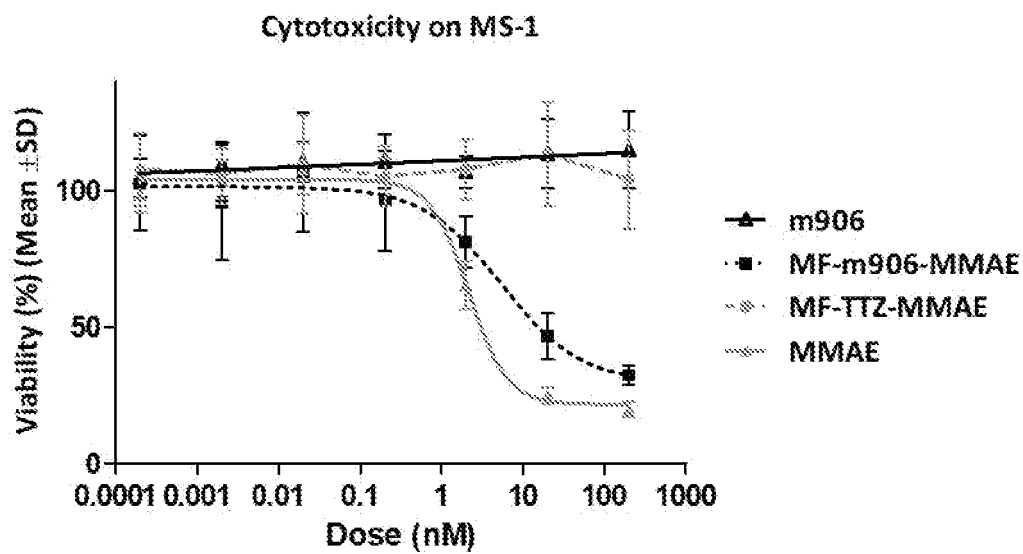
[Fig. 5B]

B



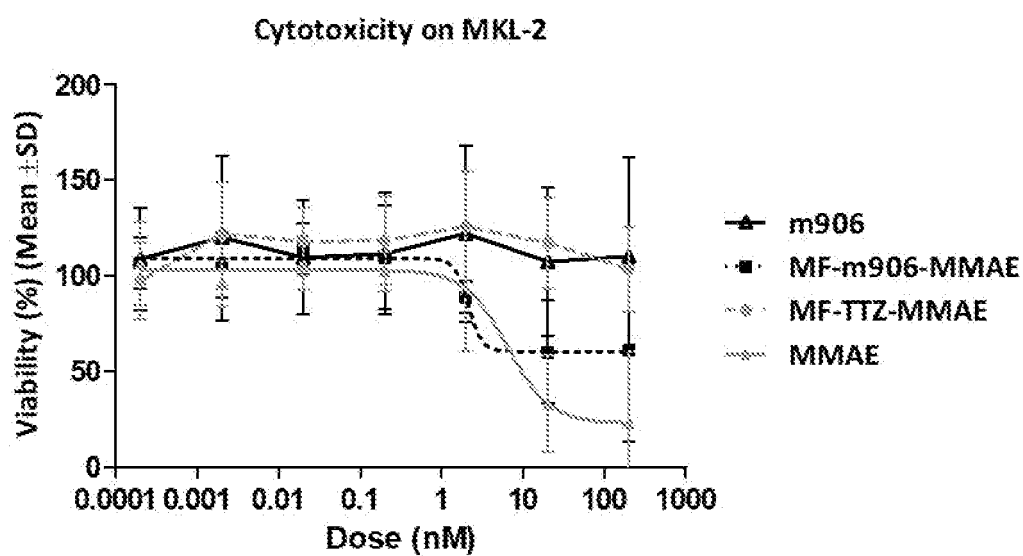
[Fig. 5C]

C



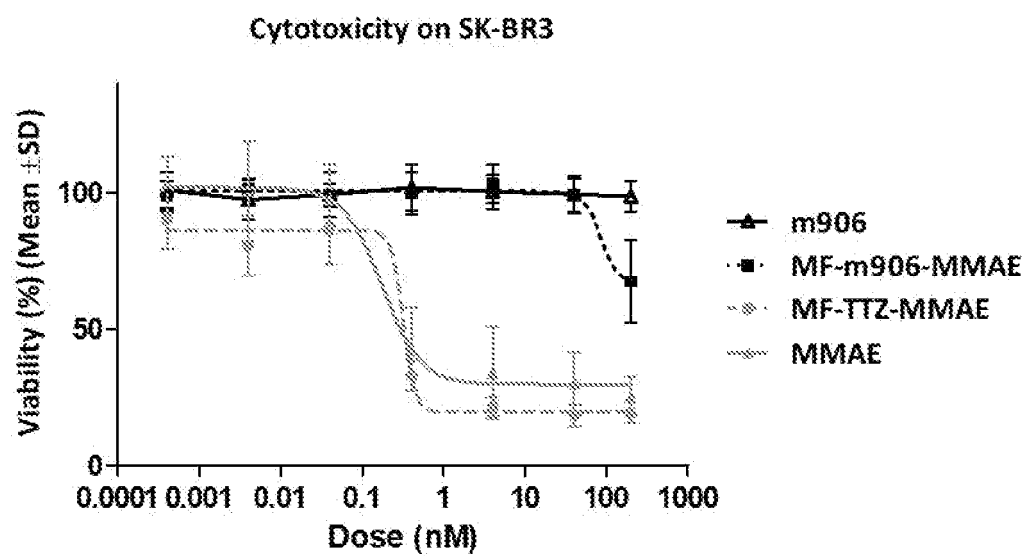
[Fig. 5D]

D

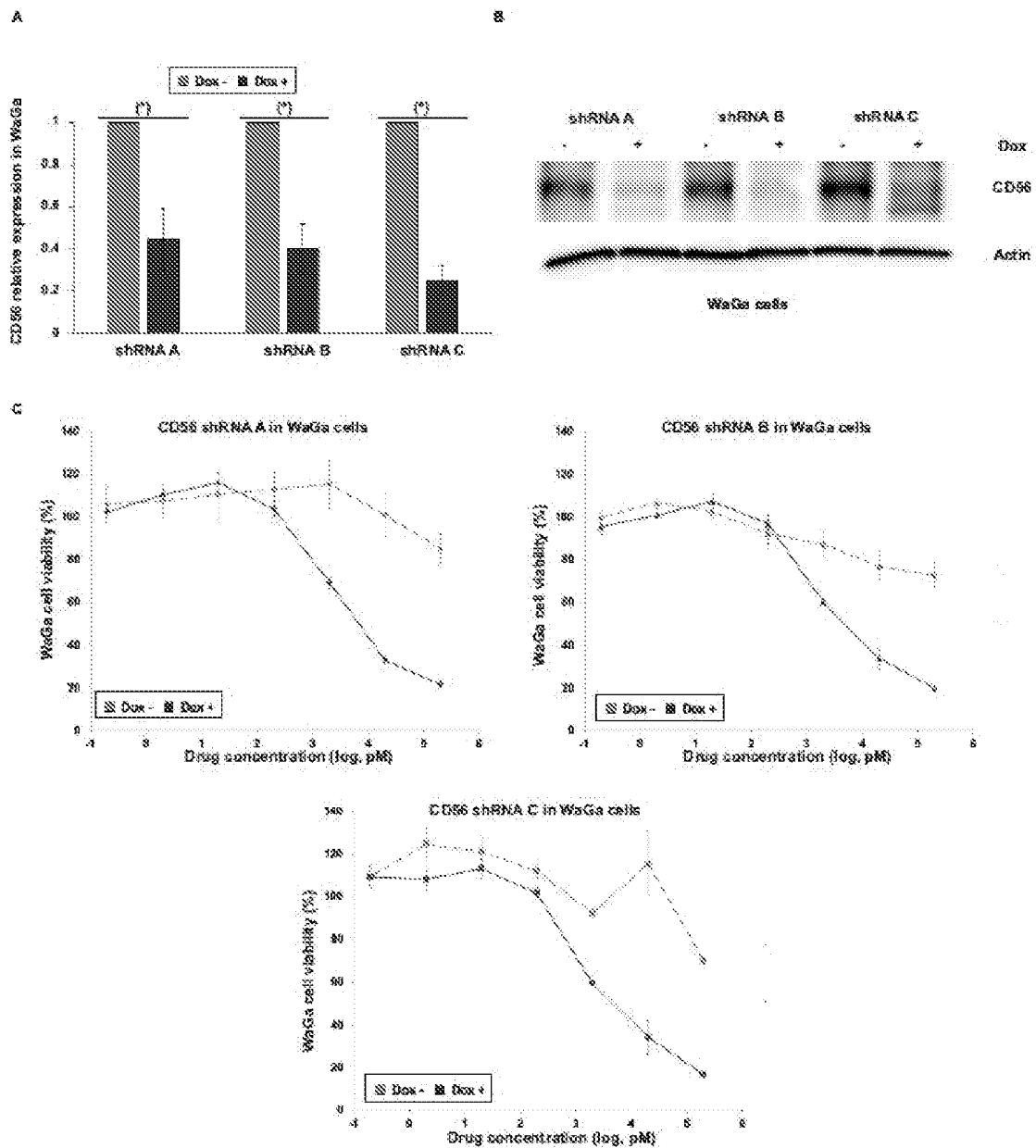


[Fig. 5E]

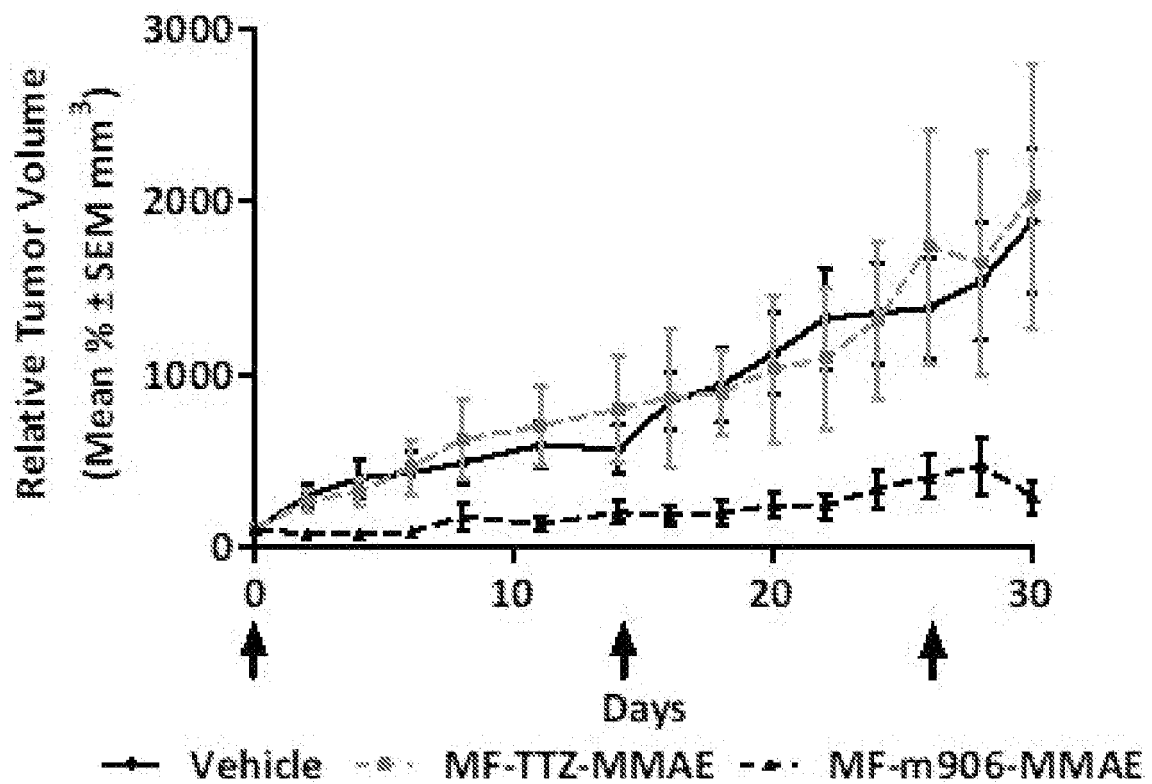
E



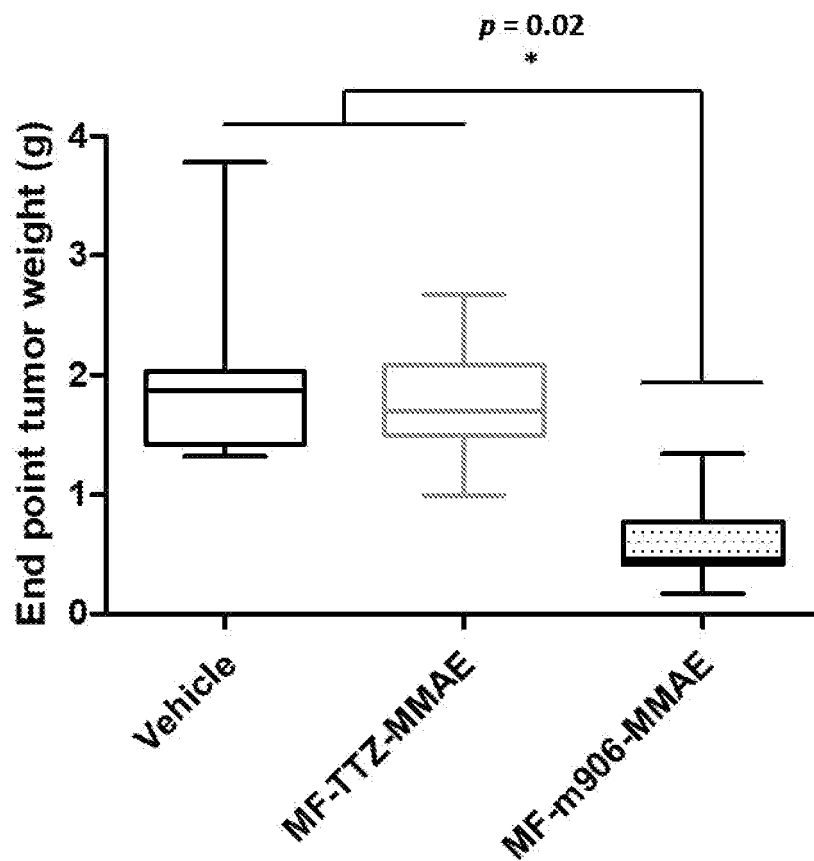
[Fig. 6A-6C]



[Fig. 7]



[Fig. 8]



SEQUENCE LISTING

<110> MC SAF

<120> Conjugués anticorps-médicament anti-CD56 et leur utilisation en
thérapie

<130> 1H317490 003 FR/BN

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR1 de la chaîne légère du m906

<400> 1

Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn
1 5 10

<210> 2

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR2 de la chaîne légère du m906

<400> 2

Tyr Leu Gly
1

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR3 de la chaîne légère du m906

<400> 3

Cys Met Gln Ser Leu Gln Thr Pro Trp Thr
1 5 10

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR1 de la chaîne lourde du m906

<400> 4

Gly Gly Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp
1 5 10

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR2 de la chaîne lourde du m906

<400> 5

Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln
1 5

<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR3 de la chaîne lourde du m906

<400> 6

Leu Ser Ser Gly Tyr Ser Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
1 5 10 15

<210> 7
<211> 219
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Chaîne légère du m906

<400> 7

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Phe Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
85 90 95

Leu Gln Thr Pro Trp Thr Phe Gly His Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 8
<211> 451
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chaîne lourde du m906

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Leu Ser Ser Gly Tyr Ser Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 9
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RNAi TRCN0000373085 Forward

<400> 9
tcccagcgtt ggagagtcca aattctcgag aatttgact ctccaacgct ttttcggg 59

<210> 10
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RNAi TRCN0000373085 Reverse

<400> 10
aaaaaagcgt tggagagtcc aaattctcga gaatttgac tctccaacgc t 51

<210> 11
<211> 55
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RNAi TRCN0000373034 Forward

<400> 11
tccccgttcc ctgaaaccgt taaactcgag tttaacggtt tcaggaacg tttt 55

<210> 12
<211> 55
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RNAi TRCN0000373034 Reverse

<400> 12

cgggaaaaac gttccctgaa accgttaaac tcgagtttaa cggtttcagg gaacg 55

<210> 13

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RNAi TRCN0000073460 Forward

<400> 13

tccccatgta cctgaagtg caatctcgag attgcacttc aaggtacatg ttttt 55

<210> 14

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RNAi TRCN0000073460 Reverse

<400> 14

cgggaaaaac atgtaccttg aagtgcaatc tcgagattgc acttcaaggt acatg 55

<210> 15

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Domaine variable de la chaîne légère du m906

<400> 15

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Phe Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
85 90 95

Leu Gln Thr Pro Trp Thr Phe Gly His Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 16
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Domaine variable de la chaîne lourde du m906

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Leu Ser Ser Gly Tyr Ser Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

☒ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

☒ Le demandeur a maintenu les revendications.

☐ Le demandeur a modifié les revendications.

☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

☒ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

☐ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

YANG FENG ET AL: "Differential killing of CD56-expressing cells by drug-conjugated human antibodies targeting membrane-distal and membrane-proximal non-overlapping epitopes",
MABS,
vol. 8, no. 4, 18 mai 2016 (2016-05-18),
pages 799-810, XP055308031,
US
ISSN: 1942-0862, DOI:
10.1080/19420862.2016.1155014

WO 2017/023780 A1 (US HEALTH [US]; THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA [US])
9 février 2017 (2017-02-09)

S WEN ET AL: "Ex vivo functional testing demonstrates sensitivity of ram subtype pediatric AML to CD56 targeting",
2019 AMERICAN SOCIETY OF PEDIATRIC HEMATOLOGY/ONCOLOGY CONFERENCE, ASPHO
2019,
vol. 66, 1 juin 2019 (2019-06-01), page
S53, XP055743306,

LIN YU ET AL: "Preparation and anti-cancer evaluation of promiximab-MMAE, an anti-CD56 antibody drug conjugate, in small cell lung cancer cell line xenograft models",
JOURNAL OF DRUG TARGETING,
vol. 26, no. 10,
26 novembre 2018 (2018-11-26), pages
905-912, XP055743269,
GB
ISSN: 1061-186X, DOI:
10.1080/1061186X.2018.1450413

CN 107 744 592 A (UNIV SICHUAN)
2 mars 2018 (2018-03-02)

CN 107 715 119 A (UNIV SICHUAN)
23 février 2018 (2018-02-23)

LIN YU ET AL: "Promiximab-duocarmycin, a new CD56 antibody-drug conjugates, is highly efficacious in small cell lung cancer xenograft models",
ONCOTARGET,
vol. 9, no. 4,
12 janvier 2018 (2018-01-12), pages

5197-5207, XP055743292,
DOI: 10.18632/oncotarget.23708

ROSSI CÉDRIC ET AL: "Antibody-Drug
Conjugates for the Treatment of
Hematological Malignancies: A
Comprehensive Review",
TARGETED ONCOLOGY, SPRINGER PARIS, PARIS,
vol. 13, no. 3, 20 mars 2018 (2018-03-20),
pages 287-308, XP036528727,
ISSN: 1776-2596, DOI:
10.1007/S11523-018-0558-1
[extrait le 2018-03-20]

TASSONE P ET AL: "IN VITRO AND IN VIVO
ACTIVITY OF THE MAYTANSINOID
IMMUNOCONJUGATE
HU1901-N2-DEACETYL-N2-(3-MERCAPTO-1-OXOPRO
PYL)-MAYTANSINE AGAINST CD56+ MULTIPLE
MYELOMA CELLS",
CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR
CANCER RESEARCH,
vol. 64, 1 juillet 2004 (2004-07-01),
pages 4629-4636, XP001222036,
ISSN: 0008-5472, DOI:
10.1158/0008-5472.CAN-04-0142

WO 2015/004400 A1 (UNIV RABELAIS FRANCOIS
[FR]) 15 janvier 2015 (2015-01-15)

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

NEANT

3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES

NEANT