

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
4 février 2016 (04.02.2016)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2016/016586 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C07K 19/00 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2015/052123

(22) Date de dépôt international :
31 juillet 2015 (31.07.2015)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
14 57504 1 août 2014 (01.08.2014) FR

(71) Déposant : LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
[FR/FR]; ZA De Courtaboeuf 3 Av des Tropiques, 91940 Les Ulis (FR).

(72) Inventeurs : MONNET, Céline; 12ter avenue du maréchal de Lattre de Tassigny, 59130 Lambersart (FR). FONTAYNE, Alexandre; 20 rue de l'abbé Lemire, 59110 La Madeleine (FR).

(74) Mandataire : CABINET PLASSERAUD; 52 rue de la Victoire, 75440 Paris Cedex 09 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a))

(54) Title : METHOD FOR PRODUCING VARIANTS HAVING AN FC WITH IMPROVED SIALYLATION

(54) Titre : PROCÉDÉ DE PRODUCTION DE VARIANTS AYANT UN FC PRÉSENTANT UNE SIALYLATION AMÉLIORÉE

(57) Abstract : The present invention relates to a method for increasing the sialylation of an Fc fragment, comprising a step of mutating at least one amino acid chosen from the amino acids in positions 240 to 243, 258 to 267 and 290 to 305 of said Fc fragment, the numbering being that of the EU index or equivalent in Kabat. The present invention also relates to a method for producing a variant of a parent polypeptide comprising an Fc fragment, said variant having improved sialylation of said Fc fragment relative to the parent polypeptide, which comprises a step of mutating at least one amino acid chosen from the amino acids in positions 240 to 243, 258 to 267 and 290 to 305 of said Fc fragment, the numbering being that of the EU index or equivalent in Kabat.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé d'augmentation de la sialylation d'un fragment Fc, comprenant une étape de mutation d'au moins un acide aminé choisi parmi les acides aminés en position 240 à 243, 258 à 267 et 290 à 305 dudit fragment Fc, la numérotation étant celle de l'index EU ou équivalent dans Kabat. La présente invention concerne également un procédé de production d'un variant d'un polypeptide parent comprenant un fragment Fc, ledit variant présentant une sialylation améliorée dudit fragment Fc par rapport au polypeptide parent, qui comprend une étape de mutation d'au moins un acide aminé choisi parmi les acides aminés en position 240 à 243, 258 à 267 et 290 à 305 dudit fragment Fc, la numérotation étant celle de l'index EU ou équivalent dans Kabat.



WO 2016/016586 A1

**PROCEDE DE PRODUCTION DE VARIANTS AYANT UN Fc PRESENTANT
UNE SIALYLATION AMELIOREE**

La présente invention concerne un procédé d'augmentation de la sialylation d'un
5 fragment Fc, comprenant une étape de mutation d'au moins un acide aminé choisi parmi
les acides aminés en position 240 à 243, 258 à 267 et 290 à 305 dudit fragment Fc, la
numérotation étant celle de l'index EU ou équivalent dans Kabat.

Les anticorps monoclonaux sont utilisés aujourd'hui en tant qu'agents thérapeutiques
10 pour traiter une variété de pathologies, y compris les cancers, les maladies auto-
immunes, les maladies inflammatoires chroniques, le rejet de greffe, les maladies
infectieuses et les maladies cardio-vasculaires. Ils constituent donc un enjeu
thérapeutique majeur. Nombre d'entre eux est déjà commercialisé, et une proportion
toujours croissante est en cours de développement ou d'essais cliniques. Cependant, il
15 existe un besoin important pour optimiser les propriétés structurales et fonctionnelles
des anticorps, afin d'en maîtriser les effets secondaires.

Une des questions critiques dans l'utilisation d'anticorps monoclonaux en thérapie est
leur persistance dans la circulation sanguine. La clairance de l'anticorps affecte
20 directement l'efficacité du traitement, et par conséquent, la fréquence et la quantité de
l'administration du médicament, qui peut entraîner des effets indésirables chez le
patient.

Les immunoglobulines d'isotype G (IgG) constituent la classe d'immunoglobulines la
25 plus fréquente chez l'homme et aussi la plus utilisée en thérapie. Différentes expériences
de mutagenèse spécifique dans la région constante (Fc) des IgG de souris ont permis
d'identifier certains résidus d'acides aminés critiques impliqués, pour certains, dans
l'interaction entre les IgG et le FcRn (Kim et al., 1994, Eur J Immunol.; 24:2429-34;
Kim et al., 1994, Eur J Immunol.; 24: 542-8; Medesan et al., 1996, Eur J Immunol. ;
30 26:2533-6; Medesan et al, 1997, J Immunol; 158:2211-7). Des études ont plus
récemment été menées chez l'homme (Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. ; 276 : 6591-
6604).

Il existe cependant toujours un besoin de trouver des anticorps, ou des fragments d'anticorps, ayant une demi-vie améliorée, et présentant des propriétés biologiques intéressantes.

5

La présente invention fournit des moyens pour obtenir un variant d'un polypeptide parent comprenant un fragment Fc ayant une sialylation optimisée. Cette sialylation optimisée, i.e. améliorée, confère notamment au variant une demi-vie augmentée, ainsi que des propriétés anti-inflammatoires optimisées par rapport à un polypeptide parent.

10 Le terme « demi-vie » se réfère à une demi-vie biologique d'un polypeptide d'intérêt dans la circulation d'un animal donné, et est représenté par le temps nécessaire à la moitié de la quantité présente dans la circulation de l'animal à être éliminée de la circulation et/ou d'autres tissus de l'animal.

En effet, de façon surprenante, les inventeurs ont découvert qu'un fragment Fc muté sur
15 une position spécifique, proche du site de N-glycosylation, présente une sialylation fortement augmentée par rapport au fragment Fc non muté. Cela permet ainsi d'augmenter les propriétés d'intérêt du fragment Fc, et notamment sa demi-vie. Cela peut permettre en outre d'augmenter son activité anti-inflammatoire.

20 La présente invention a donc pour objet un procédé d'augmentation de la sialylation d'un fragment Fc, comprenant une étape de mutation d'au moins un acide aminé choisi parmi les acides aminés en position 240 à 243, 258 à 267 et 290 à 305 dudit fragment Fc, la numérotation étant celle de l'index EU ou équivalent dans Kabat.

De préférence, ledit procédé d'augmentation de la sialylation d'un fragment Fc
25 comprend :

- une étape de mutation d'au moins un acide aminé choisi parmi les acides aminés en position 240 à 243, 258 à 267 et 290 à 305 dudit fragment Fc, la numérotation étant celle de l'index EU ou équivalent dans Kabat, puis
- une étape d'analyse de la sialylation du fragment Fc obtenu.

30

La présente invention a également pour objet un procédé de production d'un variant d'un polypeptide parent comprenant un fragment Fc, ledit variant présentant une

sialylation améliorée dudit fragment Fc par rapport à la sialylation du fragment Fc du polypeptide parent, qui comprend une étape de mutation d'au moins un acide aminé choisi parmi les acides aminés en position 240 à 243, 258 à 267 et 290 à 305 dudit fragment Fc, la numérotation étant celle de l'index EU ou équivalent dans Kabat.

5 De préférence, ledit procédé de production d'un variant d'un polypeptide parent comprenant un fragment Fc comprend :

- une étape de mutation d'au moins un acide aminé choisi parmi les acides aminés en position 240 à 243, 258 à 267 et 290 à 305 dudit fragment Fc, la numérotation étant celle de l'index EU ou équivalent dans Kabat, puis

10 - une étape d'analyse de la sialylation du fragment Fc obtenu.

De préférence, ledit procédé de production d'un variant d'un polypeptide parent comprenant un fragment Fc est tel que le variant présente au moins une activité effectrice médiée par ledit fragment Fc diminuée par rapport à l'activité effectrice du polypeptide parent.

15

Par « augmentation de la sialylation » ou « sialylation améliorée », on entend que la sialylation de la protéine obtenue est augmentée d'au moins 10%, de préférence au moins 15%, de préférence au moins 20%, de préférence au moins 25%, de préférence au moins 30%, de préférence au moins 35%, de préférence au moins 40%, de préférence au moins 45%, de préférence au moins 50%, de préférence au moins 55%, de préférence au moins 60%, de préférence au moins 65%, de préférence au moins 70%, de préférence au moins 75%, de préférence au moins 80%, de préférence au moins 85%, de préférence au moins 90%, de préférence au moins 95%, par rapport à la sialylation dudit fragment Fc avant l'étape de mutation ou dudit fragment Fc du polypeptide parent.

20

25 La sialylation d'une protéine est un mécanisme de glycosylation bien connu (voir notamment *Essentials of Glycobiology*, 2nd édition, Varki et al, 2009). Elle correspond à un ajout, par liaison covalente, d'au moins un acide sialique (i.e. acide N-acétylneuraminique et ses dérivés, comme l'acide N-glycosylneuraminique, l'acide N-acétylglycoylneuraminique) dans la chaîne glycosylée de la protéine.

30

Tel qu'ils sont utilisés ici, les termes «protéine» et «polypeptide» sont utilisés ici de manière interchangeable et se réfèrent à une séquence d'au moins deux acides aminés liés de façon covalente, incluant les protéines, polypeptides, oligopeptides et peptides.

Les termes « protéine » et « polypeptide » incluent notamment les anticorps ou immunoglobulines, notamment entiers, monoclonaux, multi-spécifiques, bi-spécifiques, 5 dual-spécifiques, synthétiques, chimériques, humanisés, humains, les protéines de fusion avec des immunoglobulines, les anticorps conjugués, et leurs fragments.

Les termes « protéine » et « polypeptide » incluent également les polypeptides Fc définis par un polypeptide comprenant tout ou partie d'une région Fc, notamment les 10 fragments Fc isolés, Fc conjugués, Fc multimériques et les protéines de fusion avec un fragment Fc.

Par « fragment Fc » ou « région Fc », on entend la région constante d'une immunoglobuline de longueur totale à l'exclusion du premier domaine de région 15 constante d'immunoglobuline (i.e. CH1-CL). Ainsi le fragment Fc fait référence à un homodimère, chaque monomère comprenant les deux derniers domaines constants des IgA, IgD, IgG (i.e. CH2 et CH3), ou les trois derniers domaines constants des IgE et IgM (i.e. CH2, CH3 et CH4), et la région charnière flexible N-terminale de ces domaines. Le fragment Fc, lorsqu'il est issu d'IgA ou d'IgM, peut comprendre la chaîne 20 J. De préférence, on utilise dans la présente invention un fragment Fc d'une IgG1, qui se compose de la charnière flexible N-terminale et des domaines CH2-CH3, c'est-à-dire la portion à partir de l'acide aminé C226 jusqu'à l'extrémité C-terminale, la numérotation étant indiquée selon l'index EU ou équivalent dans Kabat. De préférence, on utilise un fragment Fc d'une IgG1 humaine (i.e. acides aminés 226 à 447 selon 25 l'index EU ou équivalent dans Kabat). Dans ce cas, la charnière inférieure se réfère aux positions 226 à 230, le domaine CH2 fait référence aux positions 231 à 340 et le domaine CH3 se réfère aux positions 341-447 selon l'index EU ou équivalent dans Kabat. Le fragment Fc utilisé selon l'invention peut comprendre en outre une partie de la région charnière supérieure, en amont de la position 226. Dans ce cas, de préférence, 30 on utilise un fragment Fc d'une IgG1 humaine comprenant une partie de la région située entre les positions 216 à 226 (selon l'indice EU). Dans ce cas, le fragment Fc

d'une IgG1 humaine fait référence à la portion à partir de l'acide aminé 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224 ou 225 jusqu'à l'extrémité C-terminale.

La définition de « fragment Fc » inclut un fragment scFc pour « single chain Fc ». Par
5 « fragment scFc », on entend un fragment Fc simple chaîne, obtenu par fusion génétique de deux monomères Fc reliés par un linker polypeptidique. Le scFc se replie naturellement en une région Fc dimérique fonctionnelle. De préférence, le fragment Fc utilisé dans le cadre de l'invention est choisi parmi le fragment Fc d'une IgG1 ou IgG2. De préférence encore, le fragment Fc utilisé est le fragment Fc d'une IgG1.

10

Dans la présente demande, la numérotation des résidus du fragment Fc est celle de l'index EU ou équivalent dans Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

15 Dans le contexte de la présente invention, le polypeptide parent comprend un fragment Fc, appelé « fragment Fc parent ».

Par « mutation d'acide aminé », on entend ici un changement dans la séquence d'acides aminés d'un polypeptide. Une mutation est choisie notamment parmi une substitution,
20 une insertion et une délétion. Par « substitution », on entend le remplacement d'un ou plusieurs acides aminés, à une position particulière dans une séquence de polypeptide parent, par le même nombre d'autres acides aminés. De préférence, la substitution est ponctuelle, i.e. elle ne concerne qu'un seul acide aminé. Par exemple, la substitution N434S se réfère à un variant d'un polypeptide parent, dans lequel l'asparagine en
25 position 434 du fragment Fc selon l'index EU ou équivalent dans Kabat est remplacé par la sérine. Par « insertion », on entend l'addition d'au moins un acide aminé à une position particulière dans une séquence de polypeptide parent. Par exemple, l'insertion G>235-236 désigne une insertion de glycine entre les positions 235 et 236. Par
« délétion », on entend l'élimination d'au moins un acide aminé à une position
30 particulière dans une séquence de polypeptide parent. Par exemple, E294del désigne la suppression de l'acide glutamique en position 294 ; une telle délétion est appelée Del294.

Par «polypeptide parent», on entend un polypeptide non modifié qui est ensuite modifié pour générer un variant. Ledit polypeptide parent peut être un polypeptide d'origine naturelle, un variant d'un polypeptide d'origine naturelle, une version modifiée d'un polypeptide naturel ou un polypeptide synthétique. De préférence, le polypeptide parent comprend un fragment Fc choisi parmi les fragments Fc de type sauvage, leurs fragments et leurs mutants. Par conséquent, le polypeptide parent peut éventuellement comprendre des modifications pré-existantes d'acides aminés dans le fragment Fc par rapport aux fragments Fc de type sauvage. Ainsi de préférence, le fragment Fc du polypeptide parent comprend déjà au moins une mutation additionnelle (i.e. modification pré-existante), de préférence choisie parmi P230S, T256N, V259I, N315D, A330V, N361D, A378V, S383N, M428L, N434Y. De préférence, le fragment Fc du polypeptide parent comprend au moins une combinaison de mutations additionnelles choisie parmi P230S/N315D/M428L/N434Y, T256N/A378V/S383N/N434Y, V259I/N315D/N434Y et N315D/A330V/N361D/A378V/N434Y.

De préférence, selon une première alternative, le polypeptide parent consiste en un fragment Fc, et de préférence un fragment Fc entier.

De préférence, selon une seconde alternative, le polypeptide parent consiste en une séquence d'acides aminés fusionnée en N- ou C-terminal à un fragment Fc. Dans ce cas, avantageusement, le polypeptide parent est un anticorps, un polypeptide de fusion Fc ou un conjugué Fc.

De préférence, le fragment Fc du polypeptide parent est choisi parmi les séquences SEQ ID NO : 1, 2, 3, 4 et 5. De préférence, le fragment Fc du polypeptide parent a pour séquence SEQ ID NO : 1.

Les séquences représentées en SEQ ID NO : 1, 2, 3, 4 et 5 sont exemptes de région charnière en N-terminal.

Les séquences représentées en SEQ ID NO : 6, 7, 8, 9 et 10 correspondent respectivement aux séquences représentées en SEQ ID NO : 1, 2, 3, 4 et 5 avec leurs régions charnières en N-terminal. Aussi, dans un mode de réalisation particulier, le fragment Fc du polypeptide parent est choisi parmi les séquences SEQ ID NO : 6, 7, 8, 9 et 10.

De préférence, le fragment Fc du polypeptide parent a une séquence correspondant aux positions 1-232, 2-232, 3-232, 4-232, 5-232, 6-232, 7-232, 8-232, 9-232, 10-232 ou 11-232 de la séquence SEQ ID NO : 6.

- 5 Alternativement, le polypeptide parent consiste en une immunoglobuline, un anticorps ou encore en une séquence d'acides aminés fusionnée en N- ou C-terminal à un anticorps ou une immunoglobuline.

Par «variant», on entend une séquence polypeptidique qui est différente de la séquence
10 du polypeptide parent par au moins une modification d'acide aminé.

De préférence, la séquence du variant a au moins 80% d'identité avec la séquence du polypeptide parent, et plus préférentiellement au moins 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 99,5% d'identité. Par "pourcentage d'identité" entre deux
15 séquences d'acides aminés au sens de la présente invention, on entend désigner un pourcentage de résidus d'acides aminés identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties au hasard et sur toute leur longueur. Par "meilleur alignement" ou "alignement optimal", on entend l'alignement pour lequel le pourcentage d'identité déterminé comme ci-après est le plus élevé. Les comparaisons
20 de séquences entre deux séquences d'acides aminés sont traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière optimale, ladite comparaison étant réalisée par segment ou par « fenêtre de comparaison » pour identifier et comparer les régions locales de similarité de séquence. L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé, outre manuellement, au
25 moyen de l'algorithme d'homologie locale de Smith et Waterman (1981, J. Mol Evol., 18:38-46), au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Needleman et Wunsch (1970), au moyen de la méthode de recherche de similarité de Pearson et Lipman (1988, PNAS, 85: 2444-2448), au moyen de logiciels informatiques utilisant ces algorithmes (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin
30 Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI).

Dans des modes de réalisation préférés, le polypeptide parent est une immunoglobuline ou un anticorps, de préférence une IgG, et le variant selon l'invention est alors choisi parmi les variants d'IgG. Plus préférentiellement, le variant selon l'invention est choisi parmi les variants d'IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 humaines.

5

De préférence, le procédé de production d'un variant selon l'invention ou le procédé d'augmentation de la sialylation selon l'invention comprend une mutation effectuée sur au moins un acide aminé du fragment Fc situé en position 240, 241, 242, 243, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 10 299, 300, 301, 302, 303, 304 ou 305, la numérotation étant celle de l'index EU ou équivalent dans Kabat. De préférence, le procédé de production du variant ou le procédé d'augmentation de la sialylation selon l'invention comprend au moins une mutation sur le fragment Fc choisie parmi V262del, V263F, V263K, V263W, V264K, V264P, D265A, D265E, D265G, D265L, D265S, D265V, V266A, V266P, V266S, V266T, 15 S267N, S267P, S267R, S267W, P291C, P291V, P291Y, P291W, R292A, R292del, R292T, R292V, R292Y, E293F, E293P, E293W, E293Y, E294del, E294D, E294N, E294W, E294F, Q295D, Q295del, Q295F, Q295G, Q295K, Q295N, Q295R, Q295W, Y296A, Y296C, Y296del, Y296E, Y296G, Y296Q, Y296R, Y296V, S298del, S298E, S298F, S298G, S298L, S298M, S298N, S298P, S298R, S298T, S298W, S298Y, 20 Y300D, Y300del, Y300G, Y300N, Y300P, Y300R, Y300S, R301A, R301F, R301G, R301H, R301I, R301K, R301Q, R301V, R301W, R301Y, V302del, V302A, V302F, V302G, V302P, V303A, V303C, V303P, V303L, V303S, V303Y, S304C, S304M, S304Q, S304T, V305F et V305L, la numérotation étant celle de l'index EU ou équivalent dans Kabat.

25 De préférence, l'invention vise un procédé d'augmentation de la sialylation d'un fragment Fc, comprenant une étape de mutation d'au moins un acide aminé choisi parmi les acides aminés en position 240 à 243, 258 à 267 et 290 à 305 dudit fragment Fc, la numérotation étant celle de l'index EU ou équivalent dans Kabat, à l'exclusion des acides aminés en position 262 et 264.

30

L'invention vise aussi de préférence un procédé de production d'un variant d'un polypeptide parent comprenant un fragment Fc, ledit variant présentant une sialylation

améliorée dudit fragment Fc par rapport au polypeptide parent, qui comprend une étape de mutation d'au moins un acide aminé choisi parmi les acides aminés en position 240 à 243, 258 à 267 et 290 à 305 dudit fragment Fc, la numérotation étant celle de l'index EU ou équivalent dans Kabat, et dans lequel ladite étape de mutation ne porte sur aucun
5 des acides aminés en position 262 ou 264.

Ainsi, selon ces modes préférentiels, la mutation est effectuée sur l'acide aminé du fragment Fc situé en position 240, 241, 242, 243, 258, 259, 260, 261, 263, 265, 266, 267, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304 ou 305. Plus
10 préférentiellement, la mutation est effectuée sur l'acide aminé du fragment Fc situé en position 293 ou 294, la numérotation étant celle de l'index EU ou équivalent dans Kabat. Selon un mode de réalisation particulier, la mutation est effectuée sur les deux acides aminés du fragment Fc situés en position 293 et en position 294, la numérotation étant celle de l'index EU ou équivalent dans Kabat.

15

La présente invention a également pour objet un procédé de production d'un variant d'un polypeptide parent comprenant un fragment Fc, ledit variant présentant au moins une activité effectrice médiée par ledit fragment Fc, diminuée par rapport à l'activité effectrice du polypeptide parent, ledit procédé comprenant une étape de mutation d'au
20 moins un acide aminé choisi parmi les acides aminés en position 240 à 243, 258 à 267 et 290 à 305 dudit fragment Fc, la numérotation étant celle de l'index EU ou équivalent dans Kabat.

Par « activité effectrice médiée par le fragment Fc », on entend notamment la
25 cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC ou Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity), la cytotoxicité dépendante du complément (CDC ou Complement Dependent Cytotoxicity), la phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP), l'activité d'endocytose ou encore la sécrétion de cytokines. De préférence, l'activité effectrice médiée par le fragment Fc considérée dans l'invention
30 est sélectionnée parmi la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) et la phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP).

Par activité effectrice « diminuée » on entend une activité effectrice diminuée ou abolie. Ainsi, un variant d'un polypeptide parent produit par un procédé selon l'invention peut présenter au moins une activité effectrice médiée par le fragment Fc abolie. De préférence, un variant d'un polypeptide parent produit par un procédé selon l'invention présente une activité effectrice médiée par la région Fc diminuée, par rapport à celle du polypeptide parent, d'au moins 10%, de préférence d'au moins 20 %, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, ou 90%.

10 Dans un mode de réalisation particulier, l'invention fournit un procédé de production d'un variant d'un polypeptide parent comprenant un fragment Fc, ledit variant étant dépourvu de toute activité effectrice médiée par ledit fragment Fc, comprenant une étape de mutation d'au moins un acide aminé choisi parmi les acides aminés en position 240 à 243, 258 à 267 et 290 à 305 dudit fragment Fc, la numérotation étant celle de l'index EU ou équivalent dans Kabat.

De préférence selon cet aspect, l'invention fournit un procédé de production d'un variant d'un polypeptide parent comprenant un fragment Fc, ledit variant présentant au moins une activité effectrice médiée par ledit fragment Fc, diminuée par rapport à l'activité effectrice du polypeptide parent, comprenant une étape de mutation d'au moins un acide aminé choisi parmi les acides aminés en position 240 à 243, 258 à 267 et 290 à 305 dudit fragment Fc, la numérotation étant celle de l'index EU ou équivalent dans Kabat, et dans lequel l'étape de mutation ne porte sur aucun des acides aminés en position 262, 264, 293 ou 294.

25

Selon un autre aspect, la présente invention a pour objet un procédé de production d'un variant d'un polypeptide parent comprenant un fragment Fc, ledit variant présentant une affinité médiée par ledit fragment Fc, diminuée par rapport à l'affinité du polypeptide parent, pour au moins un des récepteurs de la région Fc (FcR), comprenant une étape de mutation d'au moins un acide aminé choisi parmi les acides aminés en position 240 à 243, 258 à 267 et 290 à 305 dudit fragment Fc, la numérotation étant celle de l'index EU ou équivalent dans Kabat.

30

Par « récepteur de la région Fc » ou « FcR » on entend notamment le C1q et les Récepteurs Fcγ (FcγR). Les « Récepteurs Fcγ » ou « FcγR » se réfèrent aux récepteurs des Immunoglobulines de type IgG, appelés CD64 (FcγRI), CD32 (FcγRII), et CD16 (FcγRIII), en particulier aux cinq récepteurs exprimés FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa et FcγRIIIb. Tous sont des récepteurs activateurs des cellules effectrices, hormis le FcγRIIb humain qui est un récepteur inhibiteur de l'activation des cellules immunitaires (Muta T et al., Nature, 1994, 368 :70-73).

Le complément C1q est impliqué dans l'activité CDC.

10 Le récepteur FcγRIIIa (CD16a) est, quant à lui, impliqué dans l'ADCC ; il présente un polymorphisme V/F en position 158.

Le récepteur FcγRIIa (CD32a) est, quant à lui, impliqué dans l'activation plaquettaire et la phagocytose ; il présente un polymorphisme H/R en position 131.

Enfin, le récepteur FcγRIIb (CD32b) est impliqué dans l'inhibition de l'activité cellulaire.

Par affinité « diminuée » on entend une affinité diminuée ou abolie. Préférentiellement, l'affinité est diminuée, par rapport à celle du polypeptide parent comprenant le fragment Fc, d'au moins 10%, de préférence d'au moins 20 %, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, ou 90%.

De préférence, l'invention fournit un procédé de production d'un variant d'un polypeptide parent comprenant un fragment Fc, ledit variant présentant une affinité médiée par ledit fragment Fc diminuée par rapport à l'affinité du polypeptide parent, pour au moins un des récepteurs de la région Fc (FcR) choisi parmi le complément C1q et les récepteurs FcγRIIIa (CD16a), FcγRIIa (CD32a) et FcγRIIb (CD32b), comprenant une étape de mutation d'au moins un acide aminé choisi parmi les acides aminés en position 240 à 243, 258 à 267 et 290 à 305 dudit fragment Fc, la numérotation étant celle de l'index EU ou équivalent dans Kabat.

30

Préférentiellement, le variant produit selon l'invention a une affinité médiée par le fragment Fc diminuée par rapport à celle du polypeptide parent, d'au moins 10%, de

préférence d'au moins 20 %, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, ou 90%.. En d'autres termes, l'affinité du fragment Fc muté pour un FcR est inférieure à celle du polypeptide parent. De préférence, le ratio de l'affinité médiée par le fragment Fc d'un variant selon l'invention par rapport à celle du polypeptide parent est inférieur à 0.9, de préférence inférieur à 0.8, de préférence inférieur à 0.7, de préférence inférieur à 0.6, de préférence inférieur à 0.5, de préférence inférieur à 0.4, de préférence inférieur à 0.3, de préférence inférieur à 0.2, de préférence inférieur à 0.1. Par exemple, le ratio de l'affinité médiée par le fragment Fc d'un variant selon l'invention par rapport à celle du polypeptide parent est inférieur à 0.7. De préférence encore, le ratio de l'affinité médiée par le fragment Fc d'un variant selon l'invention par rapport à celle du polypeptide parent est compris entre 0.9 et 0.1, de préférence entre 0.8 et 0.2, entre 0.7 et 0.3, ou entre 0.6 et 0.4.

L'affinité d'un polypeptide comprenant un fragment Fc pour un FcR peut être évaluée par des procédés bien connus de l'art antérieur. Par exemple, l'homme de l'art peut déterminer l'affinité (Kd) en utilisant la résonance plasmonique de surface (SPR). Alternativement, l'homme de l'art peut effectuer un test ELISA approprié. Un dosage ELISA approprié permet de comparer les forces de liaison du Fc parent et du Fc muté. Les signaux détectés spécifiques du Fc muté et du Fc parent sont comparés. L'affinité de liaison peut être indifféremment déterminée en évaluant les polypeptides entiers ou en évaluant les régions Fc isolées de ceux-ci.

Selon un mode particulier, un variant produit selon un procédé objet de l'invention présente une affinité médiée par ledit fragment Fc, diminuée par rapport à l'affinité du polypeptide parent, pour le récepteur FcγRIIIa (CD16a), et le récepteur FcγRIIa (CD32a).

De préférence selon cet autre aspect, l'invention fournit un procédé de production d'un variant d'un polypeptide parent comprenant un fragment Fc, ledit variant présentant une affinité médiée par ledit fragment Fc, diminuée par rapport à l'affinité du polypeptide parent, pour au moins un des récepteurs de la région Fc (FcR), de préférence choisi parmi le complément C1q et les récepteurs FcγRIIIa (CD16a), FcγRIIa (CD32a), et

FcgRIIb (CD32b), et comprenant une étape de mutation d'au moins un acide aminé choisi parmi les acides aminés en position 240 à 243, 258 à 267 et 290 à 305 dudit fragment Fc, la numérotation étant celle de l'index EU ou équivalent dans Kabat et dans lequel l'étape de mutation ne porte sur aucun des acides aminés en position 262, 264, 5 293 ou 294.

Selon un mode particulier, la mutation est choisie parmi une insertion, une substitution, de préférence ponctuelle, et une délétion, et est effectuée sur au moins un acide aminé situé en position 240, 241, 242, 243, 258, 259, 260, 261, 263, 265, 266, 267, 290, 291, 10 292, 295, 296, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304 ou 305, la numérotation étant celle de l'index EU ou équivalent dans Kabat.

Avantageusement, un variant d'un polypeptide parent comprenant un fragment Fc produit selon l'invention peut présenter une affinité pour le récepteur FcRn médiée par le fragment Fc, conservée ou augmentée, par rapport à ladite affinité du polypeptide parent. De préférence, la ou les mutations que comprend le variant selon l'invention n'affecte pas l'affinité pour le récepteur FcRn médiée par le fragment Fc. En d'autres termes, de préférence, le variant d'un polypeptide parent comprenant un fragment Fc produit selon l'invention comprend une ou plusieurs mutations qui n'affectent pas 15 l'affinité pour le récepteur FcRn médiée par le fragment Fc par rapport à l'affinité du polypeptide parent.

Par "FcRn" ou "récepteur Fc néonatal" tel qu'utilisé ici, on entend une protéine qui se lie à la région Fc des IgG et est codée au moins en partie par un gène FcRn. Le FcRn peut être de n'importe quel organisme, y compris, mais sans s'y limiter, les humains, les 25 souris, les rats, les lapins et les singes. Comme cela est connu dans la technique, la protéine FcRn fonctionnelle comprend deux polypeptides, souvent désignés sous le nom de chaîne lourde et de chaîne légère. La chaîne légère est la bêta-2-microglobuline et la chaîne lourde est codée par le gène FcRn. Sauf indication contraire ici, FcRn ou protéine FcRn se réfère au complexe de la chaîne α avec la bêta-2-microglobuline. Chez 30 l'homme, le gène codant pour le FcRn est appelé FCGRT.

Les séquences décrites dans la présente demande peuvent être résumées comme suit:

SEQ ID NO :	Protéine
1	Fragment Fc d'IgG1 humaine G1m1,17 (résidus 226-447 selon l'index EU ou équivalent dans Kabat) sans région charnière N-terminal.
2	Fragment Fc d'IgG2 humaine sans région charnière N-terminal.
3	Fragment Fc d'IgG3 humaine sans région charnière N-terminal.
4	Fragment Fc d'IgG4 humaine sans région charnière N-terminal.
5	Fragment Fc d'IgG1 humaine G1m3 sans région charnière N-terminal.
6	Fragment Fc d'IgG1 humaine G1m1,17 (résidus 226-447 selon l'index EU ou équivalent dans Kabat) avec région charnière N-terminal.
7	Fragment Fc d'IgG2 humaine avec région charnière N-terminal.
8	Fragment Fc d'IgG3 humaine avec région charnière N-terminal.
9	Fragment Fc d'IgG4 humaine avec région charnière N-terminal.
10	Fragment Fc d'IgG1 humaine G1m3 avec région charnière N-terminal.

Plus préférentiellement, l'étape de mutation du procédé de préparation du variant selon l'invention est obtenue comme suit :

- i) on fournit une séquence nucléique codant pour le polypeptide parent comprenant le fragment Fc ;
- ii) on modifie la séquence nucléique fournie en i) pour obtenir une séquence nucléique codant pour le variant ; et

iii) on exprime la séquence nucléique obtenue en ii) dans une cellule hôte, et on récupère le variant.

Une telle étape de mutation est donc effectuée en utilisant une séquence nucléique (polynucléotide ou séquence nucléotidique) codant pour ledit polypeptide parent (étape i)). La séquence nucléique codant pour le polypeptide parent peut être synthétisée par voie chimique (Young L and Dong Q., 2004, *Nucleic Acids Res.*, Apr 1 5;32(7), Hoover, D.M. and Lubkowski, J. 2002, *Nucleic Acids Res.*, 30, Villalobos A, et al., 2006. *BMC Bioinformatics*, Jun 6;7:285). La séquence nucléotidique codant pour le polypeptide parent peut être également amplifiée par PCR en utilisant des amorces adaptées. La séquence nucléotidique codant pour le polypeptide parent peut également être clonée dans un vecteur d'expression. L'ADN codant pour un tel polypeptide parent est inséré dans un plasmide d'expression et inséré dans une lignée cellulaire ad hoc pour sa production (par exemple la lignée HEK-293 FreeStyle, la lignée YB2/O, ou la lignée CHO), la protéine ainsi produite étant ensuite purifiée par chromatographie.

Ces techniques sont décrites en détails dans les manuels de référence : *Molecular cloning : a laboratory manual*, 3^{ième} édition-Sambrook and Russel eds. (2001) et *Current Protocols in Molecular Biology* - Ausubel et al. eds (2007).

La séquence nucléique fournie en i) (polynucléotide), qui code pour le polypeptide parent, est ensuite modifiée pour obtenir une séquence nucléique codant pour le variant. C'est l'étape ii).

Cette étape est l'étape de mutation à proprement parler. Elle peut être effectuée par toute méthode connue de l'art antérieur, notamment par mutagenèse dirigée ou par mutagenèse aléatoire. De préférence, la mutagenèse aléatoire telle que décrite dans la demande WO02/038756 est utilisée : il s'agit de la technique Mutagen. Cette technique utilise une ADN mutase humaine, notamment choisie parmi les ADN polymérases β , η et ι . Une étape de sélection des mutants ayant conservé la liaison au FcRn est nécessaire pour retenir les mutants d'intérêt.

Alternativement, les substitutions d'acides aminés sont de préférence réalisées par mutagenèse dirigée, par la technique de PCR d'assemblage utilisant des

oligonucléotides dégénérés (voir, par exemple, Zoller et Smith, 1982, Nucl. Acids Res. 10:6487-6500; Kunkel, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci USA 82:488).

Enfin, dans l'étape iii), on exprime la séquence nucléique obtenue en ii) dans une cellule hôte, et on récupère le variant ainsi obtenu.

L'hôte cellulaire peut être choisi parmi des systèmes procaryotes ou eucaryotes, par exemple les cellules bactériennes mais également les cellules de levure ou les cellules animales, en particulier les cellules de mammifères. On peut également utiliser des cellules d'insectes ou des cellules de plantes.

10

Les cellules hôtes préférées sont la lignée de rat YB2/0, la lignée de hamster CHO, en particulier les lignées CHO dhfr- et CHO Lec13, PER.C6™ (Crucell), HEK293, T1080, EB66, K562, NS0, SP2/0, BHK ou COS. De préférence encore, on utilise la lignée de rat YB2/0.

15

Alternativement, les cellules hôtes peuvent être des cellules d'animaux transgéniques modifiés pour produire le polypeptide dans le lait. Dans ce cas, l'expression d'une séquence d'ADN codant pour le polypeptide selon l'invention est contrôlée par un promoteur de caséine de mammifère ou un promoteur de lactosérum de mammifère, ledit promoteur ne contrôlant pas naturellement la transcription dudit gène, et la séquence d'ADN contenant en outre une séquence de sécrétion de la protéine. La séquence de sécrétion comprend un signal de sécrétion interposé entre la séquence codante et le promoteur. L'animal peut ainsi être choisi parmi le mouton, la chèvre, la lapine, la brebis ou la vache.

25

Le polynucléotide codant pour le variant obtenu à l'étape ii) peut également comprendre des codons optimisés, notamment pour son expression dans certaines cellules (étape iii)). Par exemple, lesdites cellules comprennent les cellules COS, les cellules CHO, les cellules HEK, les cellules BHK, les cellules PER.C6, les cellules HeLa, les cellules NIH/3T3, 293 (ATCC # CRL1573), des cellules T2, les cellules dendritiques ou les monocytes. L'optimisation de codon a pour but de remplacer les codons naturels par des codons dont les ARN de transfert (ARNt) portant les acides aminés sont les plus

30

- fréquents dans le type cellulaire considéré. Le fait de mobiliser des ARNt fréquemment rencontrés a pour avantage majeur d'accroître la vitesse de traduction des ARN messagers (ARNm) et donc d'augmenter le titre final (Carton JM et al, Protein Expr Purif, 2007). L'optimisation de codons joue aussi sur la prédiction des structures secondaires d'ARNm qui pourraient ralentir la lecture par le complexe ribosomal. L'optimisation de codons a également un impact sur le pourcentage de G/C qui est directement lié à la demi-vie des ARNm et donc à leur potentiel de traduction (Chechetkin, J. of Theoretical Biology 242, 2006 922-934).
- 5
- 10 L'optimisation de codons peut être faite par substitution des codons naturels en utilisant des tables de fréquence des codons (codon Usage Table) pour mammifères et plus particulièrement pour *Homo sapiens*. Il existe des algorithmes présents sur internet et mis à disposition par les fournisseurs de gènes de synthèse (DNA2.0, GeneArt, MWG, Genscript) qui permettent de faire cette optimisation de séquence.
- 15 De préférence, le polynucléotide comprend des codons optimisés pour son expression dans les cellules HEK, telles que des cellules HEK293, les cellules CHO, ou les cellules YB2/0. Plus préférentiellement, le polynucléotide comprend des codons optimisés pour son expression dans les cellules YB2/0. Alternativement, de préférence, le polynucléotide comprend des codons optimisés pour son expression dans les cellules
- 20 d'animaux transgéniques, de préférence la chèvre, la lapine, la brebis ou la vache.

Le variant obtenu selon l'invention peut être combiné avec des excipients pharmaceutiquement acceptables, et éventuellement des matrices à libération prolongée, comme des polymères biodégradables, pour former une composition thérapeutique.

- 25 La composition pharmaceutique peut être administrée par voie orale, sublinguale, sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, intra-artérielle, intrathécale, intra-oculaire, intra-cérébrale, transdermique, pulmonaire, locale ou rectale. Le principe actif, seul ou en association avec un autre principe actif, peut alors être administré sous forme unitaire d'administration, en mélange avec des supports pharmaceutiques classiques. Des formes
- 30 unitaires d'administration comprennent les formes par voie orale telles que les comprimés, les gélules, les poudres, les granules et les solutions ou suspensions orales, les formes d'administration sublinguale et buccale, les aérosols, les implants sous-

cutanés, transdermique, topique, intrapéritonéale, intramusculaire, intraveineuse, sous-cutanée, intrathécale, les formes d'administration par voie intranasale et les formes d'administration rectale.

De préférence, la composition pharmaceutique contient un véhicule
5 pharmaceutiquement acceptable pour une formulation susceptible d'être injectée. Il peut s'agir en particulier de formules isotoniques, stériles, de solutions salines (avec phosphate monosodique ou disodique, chlorure de sodium, de potassium, de calcium ou de magnésium et analogues, ou des mélanges de tels sels), ou de compositions lyophilisées, qui, lors de l'addition d'eau stérilisée ou de sérum physiologique selon les
10 cas, permettent la constitution de solutés injectables.

Les formes pharmaceutiques appropriées pour une utilisation injectable comprennent des solutions aqueuses stériles ou des dispersions, des formulations huileuses, y compris l'huile de sésame, l'huile d'arachide, et des poudres stériles pour la préparation extemporanée de solutions injectables stériles ou de dispersions. Dans tous les cas, la
15 forme doit être stérile et doit être fluide dans la mesure où elle doit être injectée par seringue. Elle doit être stable dans les conditions de fabrication et de stockage et doit être préservée contre l'action contaminante de micro-organismes, comme les bactéries et les champignons.

Les dispersions selon l'invention peuvent être préparées dans du glycérol, des
20 polyéthylèneglycols liquides ou leurs mélanges, ou dans des huiles. Dans des conditions normales de stockage et d'utilisation, ces préparations contiennent un conservateur pour empêcher la croissance des micro-organismes.

Le véhicule pharmaceutiquement acceptable peut être un solvant ou milieu de dispersion contenant, par exemple, l'eau, l'éthanol, un polyol (par exemple, la glycérine,
25 le propylène glycol, le polyéthylène glycol, et analogues), des mélanges appropriés de ceux-ci, et/ou les huiles végétales. La fluidité convenable peut être maintenue, par exemple, par l'utilisation d'un tensioactif, tel que la lécithine. La prévention de l'action de micro-organismes peut être provoquée par divers agents antibactériens et antifongiques, par exemple, des parabènes, le chlorobutanol, le phénol, l'acide sorbique
30 ou encore le thimérosal. Dans de nombreux cas, il sera préférable d'inclure des agents isotoniques, par exemple, des sucres ou du chlorure de sodium. L'absorption prolongée

des compositions injectables peut être provoquée par l'utilisation dans les compositions d'agents retardant l'absorption, par exemple, le monostéarate d'aluminium ou la gélatine. Les solutions injectables stériles sont préparées en incorporant les substances actives en quantité requise dans le solvant approprié avec plusieurs des autres ingrédients

5 énumérés ci-dessus, le cas échéant, suivie d'une stérilisation par filtration. En règle générale, les dispersions sont préparées en incorporant les divers ingrédients actifs stérilisés dans un véhicule stérile qui contient le milieu de dispersion basique et les autres ingrédients requis parmi ceux énumérés ci-dessus. Dans le cas de poudres stériles pour la préparation de solutions injectables stériles, les procédés de préparation préférés

10 sont le séchage sous vide et la lyophilisation. Lors de la formulation, les solutions seront administrées d'une manière compatible avec la formulation posologique et en une quantité thérapeutiquement efficace. Les formulations sont facilement administrées dans une variété de formes galéniques, telles que les solutions injectables décrites ci-dessus, mais les capsules de libération de médicament et similaires peuvent également être

15 utilisés. Pour l'administration parentérale dans une solution aqueuse par exemple, la solution doit être convenablement tamponnée et le diluant liquide rendu isotonique avec suffisamment de solution saline ou de glucose. Ces solutions aqueuses particulières conviennent particulièrement pour une administration intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée et intrapéritonéale. À cet égard, les milieux aqueux stériles qui peuvent

20 être utilisés sont connus de l'homme de l'art. Par exemple, une dose peut être dissoute dans 1 ml de solution de NaCl isotonique puis ajoutée à 1000 ml de liquide approprié, ou injectée sur le site proposé de la perfusion. Certaines variations de posologie devront nécessairement se produire en fonction de l'état du sujet traité.

25 La composition pharmaceutique de l'invention peut être formulée dans un mélange thérapeutique comprenant environ 0.0001 à 1.0 milligrammes, soit environ 0.001 à 0.1 milligrammes, soit environ de 0.1 à 1.0 milligrammes, voire environ 10 milligrammes par dose ou plus. Des doses multiples peuvent également être administrées. Le niveau de dose thérapeutiquement efficace spécifique pour un patient particulier dépendra

30 d'une variété de facteurs, y compris le trouble qui est traité et la gravité de la maladie, l'activité du composé spécifique employé, la composition spécifique utilisée, l'âge, le poids corporel, la santé générale, le sexe et le régime alimentaire du patient, le moment

de l'administration, la voie d'administration, le taux d'excrétion du composé spécifique utilisé, la durée du traitement, ou encore les médicaments utilisés en parallèle.

5 FIGURES

Figure 1 : alignements de séquences d'IgG1 humaine natif se référant aux positions 216 à 447 selon l'indice UE :

La figure 1 montre des alignements de séquences d'IgG1 humaine natif se référant aux positions 216 à 447 (selon l'indice UE) avec les séquences correspondantes d'IgG2 humaine (SEQ ID NO: 2 et 7), IgG3 humaine (SEQ ID NO: 3 et 8) et IgG4 humaine (SEQ ID NO: 4 et 9). Les séquences d'IgG1 se réfèrent à l'allotype G1m1,17 (SEQ ID NO: 1 et 6) et à l'allotype G1m3 (SEQ ID NO: 5 et 10). Le domaine "charnière inférieure CH2-CH3" de IgG1 commence à la position 226 (voir flèche). Le domaine CH2 est surligné en gris et le domaine CH3 est en italique.

Figure 2 : Demi-vie d'anticorps anti-CD20 et anti-Rhesus D produits en YB2/0 :

La persistance des immunoglobulines dans le sérum de souris transgéniques pour le FcRn humain a été évaluée. Deux spécificités antigéniques ont été testées ; les IgG anti-CD20 et les IgG anti-RhD délétées en position 294 ont été testées en comparaison avec les IgG WT correspondantes.

- A) Représente l'évolution dans le temps de la concentration des IgG plasmatiques ;
- B) Représente la demi-vie observée pour les deux IgG délétées en position 294 et des IgG WT.

EXEMPLES

Les exemples suivants sont donnés en vue d'illustrer divers modes de réalisation de l'invention.

Exemple 1 : Production des variants délétés en position 294

Les inventeurs ont analysé la sialylation de plusieurs variants conformes à l'invention, notamment délétés en position 294 (indice EU ou équivalent dans Kabat). Parmi les variants Del294 analysés, plusieurs variants comprennent une combinaison de mutations additionnelles parmi les combinaisons décrites pour conférer une liaison optimisée au FcRn dans la demande de brevet EP 0 233 500.

L'identification et l'obtention de tels variants « optimisés FcRn » peut se faire selon les méthodes décrites dans l'art antérieur, en particulier la demande de brevet européen EP 0 233 500, qui décrit l'obtention de tels mutants selon la technique dite Technique MutaGen™.

Typiquement, cette méthode comprend les étapes suivantes :

A/ Construction d'une banque de Fc

Le gène humain Fc codant pour les résidus 226 à 447 (selon l'index EU de Kabat et représenté en figure 1) dérivé de la chaîne lourde d'une IgG1 humaine est cloné dans un vecteur approprié, tel que le vecteur phagemide pMG58 selon les protocoles standards bien connus de l'homme du métier.

20 B/ Mutagenèse

Plusieurs banques sont ensuite générées, suivant la procédure décrite dans WO 02/038756, qui utilise des ADN polymérases humaines de faible fidélité dans le but d'introduire des mutations aléatoires de façon homogène sur la séquence cible entière. Plus précisément, trois mutases distinctes (pol β , η et ι) ont été utilisées dans des conditions différentes pour créer des profils de mutations complémentaires.

C/ Expression des banques de Fc par Phage-display et sélection des variants présentant une liaison améliorée au récepteur néonatal FcRn

Les banques de Fc sont exprimées en utilisant la technique du Phage-display selon des protocoles standards, pour servir à la sélection des fragments Fc. La sélection peut se faire conformément au protocole détaillé dans la demande brevet européenne EP

2 233 500, notamment par sélection sur FcRn en phase solide ou liquide, puis détermination des caractéristiques de liaisons des fragments au FcRn par ELISA.

D/ Production des variants sous forme d'Ig entière et délétion en position 294

- 5 Plusieurs combinaisons de mutations « optimisées FcRn » ont été sélectionnées pour servir de base à la production de mutants délétés en position 294. Les combinaisons suivantes ont été sélectionnées :

N315D/A330V/N361D/A378V/N434Y (T5A-74)

T256N/A378V/S383N/N434Y (C6A-78)

- 10 V259I/N315D/N434Y (C6A-74)

1- Production des variants IgG dans les cellules HEK

- La séquence de fragment Fc SEQ ID NO : 1 a été clonée dans un vecteur d'expression eucaryote générique dérivé de pCEP4 (Invitrogen) et contenant la chaîne lourde d'un anticorps chimérique anti-CD20 selon des protocoles de PCR standard. La chaîne légère
- 15 de cet anticorps a été insérée dans un vecteur dérivé de pCEP4 semblable. Toutes les mutations d'intérêt dans le fragment Fc ont été insérées dans le vecteur d'expression contenant la chaîne lourde anti-CD20 par PCR de chevauchement. Par exemple, le variant 294Del a été obtenu en utilisant deux ensembles d'amorces adaptées pour
- 20 intégrer la délétion en position 294 sur la chaîne lourde contenue dans le vecteur d'expression.

- Les fragments ainsi obtenus par PCR ont été associés et le fragment résultant a été amplifié par PCR en utilisant des protocoles standards. Le produit de PCR a été purifié
- 25 sur gels d'agarose 1% (w/ v), digéré avec les enzymes de restriction adéquates et cloné dans le vecteur d'expression de la chaîne lourde anti-CD20.

- Les cellules HEK 293 ont été cotransfectées avec les vecteurs d'expression de la chaîne légère et de la chaîne lourde de l'IgG anti-CD20 en des quantités équimolaires selon des protocoles standard (Invitrogen). Les cellules ont été cultivées de manière à produire les
- 30 anticorps de manière transitoire. Les anticorps produits ont pu être isolés et purifiés selon des techniques courantes de l'art, en vue de leur caractérisation.

2- Production des variants IgG dans les cellules YB2/0

Les variants Fc ont été préparés dans un format IgG entière dans la lignée cellulaire
5 YB2/0 (ATCC, CRL-1662) avec la spécificité anti-CD20 et anti-RhD. Pour cela, la chaîne lourde et légère des IgG ont été clonées dans un vecteur bicistronique HKCD20 optimisé pour la production dans YB2/0. La production a été réalisée dans des pools stables de cellules YB2/0.

Les étapes de production par culture cellulaire et de purification des anticorps ont été
10 réalisées selon des techniques courantes de l'art, en vue de leur caractérisation.

Les inventeurs ont vérifié que la délétion en position 294 n'avait pas d'impact significatif sur la liaison au FcRn. Les variants délétés en position 294 conservent leur liaison au FcRn par rapport à l'IgG parent (IgG WT ou IgG comprenant des mutations
15 « optimisées FcRn »).

Exemple 2 : Analyse de la sialylation de différentes protéines

Mode opératoire : préparation de l'échantillon

20 **1 Dessalage et N-déglycosylation**

Dans un premier temps, l'échantillon à analyser a été dessalé selon des protocoles standards de façon à éliminer tous les glucides réducteurs libres potentiellement présents ainsi que les substances susceptibles d'interférer durant les étapes ultérieures (sels et excipients). Après dessalage, l'échantillon a été séché puis les glycannes ont été
25 libérés par l'action enzymatique de la N-Glycannase en conditions dénaturante et réductrice, afin de maximiser le rendement de N-déglycosylation. Pour la N-déglycosylation des Ig, l'échantillon sec a été repris par 45 µL de la solution de digestion PNGase F diluée au 1/5. 1,5 µL d'une solution de β-mercaptoéthanol 10 % (v/v) dans l'eau ultra-pure a été ajouté avant agitation et incubation 15 minutes à
30 température ambiante. Ensuite, 1 µL de la solution de PNGase F (2.5 mU/µL) a été ajoutée avant agitation et incubation au bain-marie à 37° C durant 12 à 18 heures. Puis les glycannes ont été séparés des protéines déglycosylées par précipitation à l'EtOH froid.

L'extrait glycanique obtenu a alors été reparti en 4 fractions avant d'être traité par des exoglycosidases.

2 Quantification des taux de fucosylation et de GlcNAc intercalaire, et de l'indice de galactosylation des N-glycannes

Chaque N sous-fraction alcoolique séchée, renfermant l'équivalent de 100 µg de glycoprotéine, a été respectivement digérée (1) par les α -sialidase, β -galactosidase et N-acétyl- β -hexosaminidase, afin de déterminer le taux de fucosylation ; (2) par les α -sialidase, β -galactosidase et α -fucosidase, pour le calcul du taux de GlcNAc intercalaire; et (3) par les α -sialidase et α -fucosidase, pour déterminer l'indice de galactosylation.

Ces déglycosylations ont été effectuées à 37°C pendant 12 à 18 heures.

L'isolement des produits de dégradations exoglycosidasiques a été réalisé par extraction alcoolique à froid par ajout de 60 µL (3 volumes) d'éthanol absolu équilibré à - 20°C, avant agitation puis incubation à - 20°C durant 15 minutes. Une centrifugation à 10000 rpm a été réalisée pendant 10 minutes à + 4°C, et le surnageant a été immédiatement transféré dans un microtube de 0.5 mL avant d'être séché sous vide.

Les oligosaccharides obtenus ont ensuite été marqués par un fluorochrome, l'APTS, puis séparés et quantifiés en HPCE-LIF.

3 Exploitation des résultats

L'identification des pics de N-glycannes est réalisée à l'aide d'un étalon glycoprotéinique de référence dont la N-glycosylation est parfaitement connue, par comparaison des temps de migration de ses N-glycannes avec ceux des espèces observées sur les profils électrophorétiques des échantillons à analyser. De plus, les temps de migration des oligosaccharides étalons sont convertis en unités de glucose (GUs) après analyse d'un mélange hétérogène d'un homopolymère de glucose (*Glc ladder*). Ces valeurs de GUs seront ensuite comparées à celles de quelques oligosaccharides standards de GUs connues, et permettront d'augmenter l'indice de confiance des identifications.

Résultats**A-Variants produits dans YB2/0**

Les polypeptides suivants ont été analysés :

5

Nom	Mutations
Anti-CD20 Del294	Del294
Anti-CD20-C6A_78-Del294	T256N/A378V/S383N/N434Y/Del294
Anti-CD20-C6A_74-Del294	V259I/N315D/N434Y/Del294
Anti-RhD	-
Anti-RhD Del294	Del294
Anti-RhD -C6A_78	T256N/A378V/S383N/N434Y
Anti-RhD -C6A_78-Del294	T256N/A378V/S383N/N434Y/Del294

Anti-CD20 Del294 :

Les électrophorégrammes obtenus montrent des structures glycaniques biantennées. Ces structures sont majoritairement sialylées.

- 10 87.98% des structures semblent sialylées. Le taux de fucosylation calculé est de 48.24%.

A2	11.9
A2F	19.8
A1	5.5
A1F	1.6
G0	0.84
G0B	0.96
G1(1.6)+G0F	0.53
G1(1.3) + G0BF	0.19
G1(1.6)B	2.44
G1(1.6)F	0.14
G2 + G1(1.3)F	2.09
G2B	0.51
G2F	0.16
G2FB	3.84
Structures sialylées non identifiées	49.18
%tage de structures sialylées :	87.98
%tage de fucosylation :	48.24

Anti-CD20-C6A 78-Del294 :

Les électrophorégrammes obtenus montrent des structures glycaniques biantennées.

- 5 Ces structures sont majoritairement sialylées.

88.69% des structures semblent sialylées. Le taux de fucosylation calculé est de 51.87%.

A2	12.94
A2F	20.61
A1	7.52
A1F	3.12
G0	1.57
G0B	0.61
G1(1.6)+G0F	1.38
G1(1.3) + G0BF	0.58
G1(1.6)B	1.99
G1(1.6)F	0.51
G2 + G1(1.3)F	3.56
G2B	0.26
G2F	0.6
G2FB	0
Structures sialylées NI	44.5

%tage de structures sialylées :	88.69
%tage de fucosylation :	51.87

Anti-CD20-C6A 74-Del294 :

Les électrophorégrammes obtenus montrent des structures glycaniques biantennées.

- 5 Ces structures sont majoritairement sialylées.

93.48% des structures semblent sialylées. Le taux de fucosylation calculé est de 51.24%.

A2	13.39
A2F	23.01
A1	5.57
A1F	1.93
G0	0.59
G0B	0.73
G1(1.6)+G0F	0.43
G1(1.3) + G0BF	0.18
G1(1.6)B	2
G1(1.6)F	0.11
G2 + G1(1.3)F	2.05
G2B	0.15
G2F	0.1
G2FB	0
Structures sialylées Ni	49.58

%tage de structures sialylées :	93.48
%tage de fucosylation :	51.24

Anti-RhD :

Les électrophorégrammes obtenus montrent des structures glycaniques biantennées constituées majoritairement de structures courtes agalactosylées non-fucosylées (G0 : 52.06%). Les structures fucosylées sont minoritaires. On observe quelques structures possédant une GlcNac en position bissectrice (G0B, G0FB).

La structure oligosaccharidique prédominante est : G0 (52.06%). Le taux de fucosylation calculé est de 17.05%, le taux de fucosylation obtenu avec le run DSial + DGal + DhexNAc (*) est de 13.07%. Le taux de formes possédant une GlcNac bissectrice est de 2.87%. Le taux de galactosylation calculé est de 40.5%.

Structure (%)	HPCE-LIF
Sialylated	0.00
Mono-sialylated	0.00
Bi-sialylated	0.00
Bisecting	2.87
Fucosylated*	13.07
Fucosylated	17.05
A2	0.00
A2F	0.00
M3N2	0.00
M3N2F	0.00
A1	0.00
A1F	0.00
G2FB	0.00
G2F	0.47
G2B	0.00
G2	4.66
G1FB	0.00
G1F	5.65
G1{1,3}FB	0.00
G1{1,6}FB	0.00
G1{1,3}F	0.00
G1{1,6}F	5.65
G1B	0.00
G1	24.59
G1{1,3}B	0.00
G1{1,6}B	0.00
G1{1,3}	4.00
G1{1,6}	20.59
G0FB	1.24
G0F	9.69
G0B	1.63
G0	52.06
MAN-5	0.00
Identifiés (%)	99.99

Anti-RhD Del294 :

- Les électrophorégrammes obtenus montrent des structures glycaniques biantennées et quelques structures triantennées. Ces structures sont majoritairement sialylées.
- 5 92.25% des structures semblent sialylées. Le taux de fucosylation calculé est de 37.08%.

A2	14.03
A2F	20.61
A1	6.79
A1F	1.59
G0	0.63
G0B	0.82
G1[1.6]+G0F	0
G1[1.3] + G0BF	0.72
G1[1.6]B	2.86
G1[1.6]F	0
G2 + G1[1.3]F	2.72
G2B	0
G2F	0
G2FB	0
Structures sialylées Ni	49.21

%tage de structures sialylées :	92.23
%tage de fucosylation :	37.08

Anti-RhD -C6A 78:

- La structure oligosaccharidique prédominante est : G0 (55.20%). Le taux de fucosylation calculé est de 12.37%, le taux de fucosylation obtenu avec le run DSial + DGal + DhexNAc (*) est de 10.63%. Le taux de formes possédant une GlcNac bissectrice est de 2.27%. Le taux de galactosylation calculé est de 39.13%.

Structure (%)	HPCE-LIF
Sialylated	0.00
Mono-sialylated	0.00
Bi-sialylated	0.00
Bisecting	2.27
Fucosylated*	10.63
Fucosylated	12.37
A2	0.00
A2F	0.00
M3N2	0.00
M3N2F	0.00
A1	0.00
A1F	0.00
G2FB	0.00
G2F	0.00
G2B	0.00
G2	4.00
G1FB	0.00
G1F	4.20
G1(1,3)FB	0.00
G1(1,6)FB	0.00
G1(1,3)F	0.00
G1(1,6)F	4.20
G1B	0.83
G1	26.10
G1(1,3)B	0.00
G1(1,6)B	0.83
G1(1,3)	5.67
G1(1,6)	20.43
G0FB	0.66
G0F	7.51
G0B	1.50
G0	55.20
MAN-5	0.00
Identifiés (%)	100.00

Anti-RhD -C6A 78-Del294 :

Les électrophorégrammes obtenus montrent des structures glycaniques biantennées et quelques structures triantennées. Ces structures sont majoritairement sialylées.

91.83% des structures semblent sialylées. Le taux de fucosylation calculé est de 57.81%.

A2	14.6
A2F	20.57
A1	7.72
A1F	3.38
G0	1.15
G0B	1.75
G1(1.6)+G0F	0
G1(1.3) + G0BF	0.62
G1(1.6)B	3.14
G1(1.6)F	0
G2 + G1(1.3)F	1.53
G2B	0
G2F	0
G2FB	0
Structures sialylées NI	45.56
%stage de structures sialylées :	91.83
%stage de fucosylation :	57.81

B- Variants produits dans des lignées HEK

Les polypeptides suivants ont été analysés (Anti-CD20 IgG variants) :

5

Nom	Mutations
T5A-74	N315D/A330V/N361D/A378V/N434Y
T5A-74H	V264E/N315D/A330V/N361D/A378V/N434Y
T5A-74Del294	E294del/N315D/A330V/N361D/A378V/N434Y
WT	/

Le variant T5A-74H diffère du variant parent T5A-74 par la mutation V264E. Le mutant T5A-74Del294 diffère du variant parent T5A-74 par la délétion de l'acide aminé en position 294.

Ils ont par la suite analysé le profil de glycosylation de ces variants. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-après (en pourcentage) :

10

	T5A-74	T5A-74H	T5A- 74Del294	WT
A1	0	1,8	5,64	0
A1F	0	6,72	9,18	0
Non identifiées sialylées	0	29,28	19,56	0
G0	0	2,37	0	3,34
G0B	2,13	0,65	0	1,77
G1(1.6)	0	1	0	0
G0F	81,44	10,27	28,76	79,47
G1(1.3)	0	1,21	0	0
G0FB	1	0	4,92	0,88
G1(1.6)B	0,51	0	0	0,71
G1(1.6)F	10,08	12,15	6,64	9,23
G2	0	1,85	0	0
G1(1.3)F	4	3,26	10,63	3,68
G1(1.6)FB	0	0	0	0
G2B	0	6,41	2	0
G2F	0,84	5,57	5,94	0,91
G2FB	0	1,65	1,57	0
Galactosylation	16,27	>58,36	>51,11	15,44
Sialylation	0	>37,8	>34,38	0
Fucosylation	97,36	>40,88	>67,64	94,17

Exemple 3 : Analyse de la demi-vie des IgG délétees en position 294

La persistance des Immunoglobulines dans le sérum de souris transgéniques pour le FcRn humain a été évaluée. Deux spécificités antigéniques ont été testées ; les IgG anti-CD20 et les IgG anti-RhD délétees en position 294 ont été testées en comparaison avec les IgG WT correspondantes.

Des expériences de pharmacocinétique ont ainsi été effectuées chez la souris hFcRn qui sont homozygotes pour un allèle KO du FcRn murin et hétérozygote pour un transgène de FcRn humain (mFcRn^{-/-} hFcRnTg).

Pour ces études pharmacocinétiques, chaque animal a reçu une seule injection intraveineuse d'IgG à 5 mg / kg au niveau du sinus rétro-orbital, dans un protocole similaire à celui décrit précédemment (Petkova SB, et al. Enhanced half-life of genetically engineered human IgG1 antibodies in a humanized FcRn mouse model: potential application in humorally mediated autoimmune disease. Int Immunol 2006).

Des échantillons de sang ont été prélevés à partir du sinus rétro-orbital à de multiples points de temps et les IgGs titrée par ELISA.

Résultats :

Dans cet essai, les deux IgG délétées en position 294 ont montré une augmentation de la demi-vie avec un ratio (demi-vie variant/WT) de 1,7 (**Figure 2**).

5

Les paramètres analysés sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

Molécules	C0 ($\mu\text{g/mL}$)	AUC0-t (h. $\mu\text{g/mL}$)	AUCinf (h. $\mu\text{g/mL}$)	t1/2 elim (h)	Vd (mL)	Cl (mL/h)
Anti-CD20 WT	121	1423	1425	29.2	4.07	0.097
Anti-CD20 Del294	120	3482	3673	48.6	2.64	0.037
Anti-RhD WT	150	7491	8030	65.7	1.62	0.017
Anti-RhD Del294	141	11142	13354	111	1.66	0.010

Les paramètres analysés sont définis ci-dessous :

C0 : Concentration maximale extrapolée à T0

10 AUC0-t : Aire sous la courbe temps/concentration plasmatique (du temps T0 au dernier temps t où l'anticorps est encore quantifiable)

AUCinf : Aire sous la courbe temps/concentration plasmatique de T0 à l'infini (= AUC0-t + extrapolation jusqu'à l'infini)

T1/2 : Demi-vie

15 Vd : Volume de distribution

Cl : Clairance

Exemple 4 : Production de variants Fc additionnels par mutagenèse dirigée et tests de liaison sur les récepteurs Fc :

20

1. Construction des variants Fc :

Chaque mutation d'intérêt dans le fragment Fc a été insérée indépendamment dans un vecteur d'expression contenant la chaîne lourde anti-CD20 par PCR de chevauchement en utilisant deux ensembles d'amorces adaptées pour intégrer une délétion ou un codon dégénéré (NNN ou NNK) en position ciblée (240 à 243, 258 à 267, 290 à 305). Les fragments ainsi obtenus par PCR ont été associés et le fragment résultant a été amplifié par PCR en utilisant des protocoles standards. Le produit de PCR a été purifié sur gels

25

d'agarose 1% (w/ v), digéré avec les enzymes de restriction adéquates et cloné dans le vecteur d'expression eucaryote pMGM05-CD20 (pCEP4 InvitroGen), qui contient des sites de clonage pour le fragment Fc (BamHI et NotI) et la chaîne variable VH de l'anticorps anti-CD20. Cette construction entraîne la mutation de deux acides aminés dans le Fc (aa224 et 225, HT changé en GS) et l'ajout de la séquence EFAAA en C-terminal du Fc, mais permet de tester très rapidement un très grand nombre de clones. Dans un premier temps, il a été vérifié que ces mutations ne modifiaient pas la liaison de l'IgG-WT aux différents récepteurs. Par la suite, les contrôles positifs ont été clonés dans ce système afin de le valider :

- 10 - IgG1-S239D, I332E, provenant de l'anticorps anti-CD19 XmAb5574 de Xencor (C1) : témoin positif pour CD16a ;
- IgG1-G236A, provenant de Xencor (C4) : témoin positif pour CD32aH/R ;
- IgG1-K326W, E333S, provenant d'Abgenix/Genentech (C3) : témoin positif pour C1q ; et
- 15 - IgG1-S267E, L328F, provenant de l'anticorps anti-CD19 XmAb5574 de Xencor (C5) : témoin positif pour CD32b.

L'ADN des clones isolés a été séquencé après PCR sur colonies. Après analyses bioinformatiques, les clones comportant des mutations nouvelles ont été congelés à -80°C en bactérie XL1-Blue et les séquences incluses dans notre base de données. Ainsi, 20 268 variants ont été construits.

2. Production des IgG variants en cellules HEK293 :

La chaîne légère de l'anti-CD20 a été insérée dans un vecteur pCEP4 identique au vecteur utilisé pour la chaîne lourde, noté pMGM01-CD20 (pCEP4 InvitroGen). Des 25 cellules HEK293-F Freestyle™ (Invitrogen), cultivées dans des plaques à 24 puits, ont été co-transfectées avec les vecteurs pMGM01-CD20 et pMGM05-CD20 (Fc-WT et variants) dans des quantités équimolaires (250 ng/ml) avec un réactif de transfection (1 µl/ml) en utilisant des protocoles standard (Invitrogen). Les cellules ont été cultivées en suspension dans du milieu exempt de sérum pendant 7-9 jours post-transfection et les 30 surnageants (1 ml) contenant des IgG ont été récoltés après centrifugation des cellules à 100 g pendant 10 min. Les IgG sécrétées dans les surnageants ont été quantifiées en utilisant un test ELISA (FastELISA, R&D biotech).

3. Récepteurs Fc recombinants utilisés :

CD16a est un récepteur activateur qui présente un polymorphisme V/F en position 158, sur le site de liaison au Fc. L'affinité est meilleure pour CD16aV. CD16aV est
5 disponible commercialement (R&D system).

CD32a est un récepteur activateur qui présente un polymorphisme H/R en position 131, sur le site de liaison au Fc. L'affinité est meilleure pour CD32aH. CD32aH a été produit par PX'Therapeutics. CD32aR et CD32b sont disponibles commercialement (R&D system).

10

4. Tests ELISA de variants IgG produits dans les surnageants de cellules HEK293-F :

Les variants d'IgG ont été testés pour leur liaison à plusieurs FcR humains et au FcRn par ELISA. Des immunoplaques Maxisorp ont été revêtues avec 0,1 µg CD32aH / puits,
15 ou 0,2 µg CD16aV / puits dans du PBS ou 0,25 µg de FcRn dans du P6 (sodium phosphate 100mM, sodium chloride 50mM pH6.0). Des plaques NiNTA (HisGrab Pierce) ont été revêtues avec 0,05µg CD32aR / puits, ou 0,2µg CD32b / puits dans du PBS. Après le revêtement pendant une nuit à 4°C, les plaques ont été lavées deux fois avec du PBS (ou P6)/0,05% Tween-20 et saturées avec du PBS/4% de BSA (ou P6 4%
20 lait-écrémé) pendant 2 heures à 37°C. En parallèle, les surnageants ont été dilués dans du PBS (ou du P6 pour le test sur FcRn) à une concentration finale de 0,5 µg d'IgG/ml et mélangés avec des F(ab')₂ d'IgG HRP de chèvre anti-humaine à la même concentration pendant 2 heures à température ambiante. Les IgG agrégées aux F(ab')₂ sont ensuite incubées sous agitation douce pendant 1 heure à 30°C sur les plaques
25 ELISA saturées sans dilution pour CD16aV, CD32aR et CD32b (i.e. IgG à 0,5 µg/ml), diluées dans du PBS à 0,25 µg/ml pour CD32aH et dilués dans du P6 à 0,035 µg/ml pour FcRn. Les plaques sont ensuite révélées avec TMB (Pierce) et l'absorbance est lue à 450 nm.

Grâce à ce test ELISA, les variants construits ont été testés en comparaison avec le type sauvage Fc (Fc-WT) et leur ratio variant/Fc-WT a été calculé, comme indiqué dans les
30 tableaux 1 à 3.

Tableau 1: Variants retenus avec mutation entre les positions 262 et 267

clone	mutations	CD16aV	CD32aH	CD32aR	CD32b	FcRn
D262	V262DEL	0,60	0,72	0,14	0,34	1,09
ZAC2-44	V263F	0,60	0,45	0,48	0,34	0,83
ZAC2-23	V263K	0,66	0,34	0,37	0,42	1,02
ZAC2-109	V263W	0,86	0,32	0,67	0,72	0,83
ZAC2-76	V264K	0,57	0,37	0,46	0,45	0,95
ZAC2-123	V264P	0,74	0,58	1,06	0,87	1,03
ZAC2-143	D265A	0,57	0,87	0,21	0,30	1,07
ZAC2-21	D265E	0,60	0,57	1,18	0,57	1,36
ZAC2-113	D265G	0,80	0,34	0,61	0,68	0,89
ZAC2-112	D265L	0,88	0,31	0,62	0,76	0,73
ZAC2-168	D265S	0,80	0,62	0,57	0,80	1,19
ZAC2-115	D265V	0,93	0,52	0,62	0,80	0,76
ZAC2-108	V266A	0,63	0,99	0,83	1,01	1,17
ZAC2-157	V266P	0,60	0,35	0,53	0,94	0,89
ZAC2-118	V266S	0,38	0,11	0,71	0,48	1,00
ZAC2-93	V266T	0,63	0,50	0,92	0,94	1,03
J3A-56	S267N	0,29	NA	0,25	0,71	1,13
ZAC2-141	S267P	0,96	0,52	0,54	0,94	1,06
ZAC2-129	S267R	0,54	0,69	0,17	0,31	1,18
ZAC2-126	S267W	0,66	0,33	0,59	0,88	1,23

5 Tableau 2: Variants retenus avec mutation entre les positions 291 et 296

clone	mutations	CD16aV	CD32aH	CD32aR	CD32b	FcRn
ZAC3-258	P291C	0,41	1,15	1,12	NA	0,79
ZAC3-79	P291V	0,50	1,33	1,14	1,11	1,25
ZAC3-74	P291Y	0,47	1,21	0,89	0,46	1,29
ZAC3-43	P291W	0,65	1,78	1,28	0,51	1,51
ZAC3-01	R292A	1,20	0,91	0,34	0,33	0,98
D292	R292DEL	0,14	0,71	0,35	NA	0,50
ZAC3-69	R292T	0,58	1,75	0,69	0,36	1,00
ZAC3-27	R292V	0,71	1,37	0,41	0,45	1,08
ZAC3-77	R292Y	0,63	0,58	0,42	0,49	1,44
ZAC3-259	E293F	0,18	0,54	0,75	NA	0,98
ZAC3-03	E293P	0,31	0,13	0,11	0,26	0,80
ZAC3-57	E293W	0,44	0,21	0,58	0,31	1,36
ZAC3-233	E293Y	0,24	0,67	1,00	NA	1,12
ZAC3-23	E294D	0,37	0,50	0,26	0,37	1,36
ZAC3-243	E294N	0,37	1,67	0,84	NA	1,08
ZAC3-117	E294W	1,61	1,12	0,66	NA	1,00
ZAC3-215	E294F	0,32	0,87	1,18	NA	0,94

ZAC3-151	Q295D	0,51	0,35	0,40	NA	0,74
D295	Q295DEL	0,13	0,35	0,19	NA	0,68
ZAC3-179	Q295F	0,43	0,60	0,51	NA	0,88
ZAC3-58	Q295G	0,34	0,17	0,33	0,33	1,05
ZAC3-131	Q295K	0,54	1,27	0,66	NA	0,98
ZAC3-252	Q295N	0,53	1,06	0,89	NA	1,09
ZAC3-130	Q295R	0,39	0,65	0,98	NA	0,72
ZAC3-37	Q295W	0,30	0,23	0,21	0,39	0,96
ZAC3-25	Y296A	0,49	0,71	0,61	0,65	1,02
ZAC3-36	Y296C	0,42	0,77	1,53	1,47	0,78
D296	Y296DEL	0,91	0,18	0,35	0,46	0,86
ZAC3-16	Y296E	0,50	1,32	0,73	0,96	1,20
ZAC3-212	Y296G	0,18	0,65	0,65	NA	0,89
ZAC3-50	Y296Q	0,65	1,34	1,27	0,51	1,32
ZAC3-128	Y296R	0,52	0,89	0,97	NA	1,13
ZAC3-09	Y296V	0,74	0,76	0,63	0,61	0,96

Tableau 3: Variants retenus avec mutation entre les positions 298 et 305

clone	mutations	CD16aV	CD32aH	CD32aR	CD32b	FcRn
D298	S298DEL	0,47	0,16	0,10	0,51	0,84
ZAC4-200	S298E	0,31	0,09	0,07	0,25	1,14
ZAC4-138	S298F	0,46	0,27	0,33	0,53	0,64
ZAC4-65	S298G	0,87	0,29	1,01	0,96	1,24
ZAC4-04	S298L	0,98	0,52	1,11	1,03	1,13
ZAC4-133	S298M	0,57	0,55	0,56	0,57	1,04
ZAC4-205	S298N	0,51	0,18	0,13	0,24	1,13
ZAC4-35	S298P	0,74	0,21	0,19	0,45	1,05
ZAC4-130	S298R	0,62	0,33	0,90	0,68	1,35
ZAC4-18	S298T	1,16	1,21	0,80	0,63	1,08
ZAC4-275	S298W	0,54	0,25	0,09	0,27	1,01
ZAC4-19	S298Y	0,85	0,22	0,41	0,45	1,28
ZAC4-135	Y300D	0,48	0,83	0,84	1,12	1,07
D300	Y300DEL	0,35	0,11	0,09	0,21	0,45
ZAC4-80	Y300G	0,73	0,66	0,71	0,52	1,15
ZAC4-61	Y300N	0,37	0,55	0,96	0,58	0,94
ZAC4-153	Y300P	0,30	0,06	0,77	0,36	0,73
ZAC4-278	Y300R	0,26	0,12	0,48	0,38	0,76
ZAC4-13	Y300S	0,93	1,02	0,49	0,82	1,04
ZAC4-187	R301A	0,45	0,59	1,60	1,47	1,04
ZAC4-106	R301F	0,52	0,44	1,12	1,33	0,91
ZAC4-54	R301G	0,33	0,20	0,89	0,61	0,90
ZAC4-01	R301H	1,05	0,54	0,86	0,67	1,06
ZAC4-74	R301I	0,35	0,58	0,57	0,44	0,65
ZAC4-224	R301K	0,42	0,39	0,99	0,76	1,02
ZAC4-110	R301Q	0,46	0,26	1,10	1,02	1,02
ZAC4-186	R301V	0,52	0,57	0,52	0,53	0,50
ZAC4-07	R301W	0,74	0,20	0,57	0,58	0,76
ZAC4-141	R301Y	0,43	0,36	0,60	0,79	0,50
D302	V302DEL	0,39	0,11	0,06	0,22	0,55
ZAC4-268	V302A	0,65	1,74	1,54	1,46	1,25
ZAC4-131	V302F	0,42	1,66	1,07	0,85	0,76
ZAC4-55	V302G	0,62	1,26	1,29	1,47	1,15
ZAC4-281	V302P	0,41	0,15	0,13	0,22	0,60
Fc-B	V303A	0,42	NA	0,59	0,51	1,06
ZAC4-137	V303C	0,58	0,61	0,98	1,19	1,12
ZAC4-115	V303P	0,64	0,82	0,80	0,72	1,04
ZAC4-136	V303L	0,48	0,47	0,99	0,76	1,14
ZAC4-208	V303S	0,35	0,40	0,98	0,76	0,95
ZAC4-144	V303Y	0,58	1,02	1,17	1,42	0,66
ZAC4-170	S304C	0,47	0,38	0,28	0,33	1,26
ZAC4-195	S304M	0,47	0,31	0,21	0,25	0,61
ZAC4-127	S304Q	0,69	0,68	0,70	0,58	0,94
ZAC4-219	S304T	0,53	0,93	1,83	1,45	0,89
ZAC4-229	V305F	1,08	0,08	1,55	1,25	1,11
ZAC4-139	V305L	0,67	0,75	0,97	0,96	0,67

REVENDICATIONS

1. Procédé d'augmentation de la sialylation d'un fragment Fc, comprenant une étape de mutation d'au moins un acide aminé choisi parmi les acides aminés en position 240 à 243, 258 à 267 et 290 à 305 dudit fragment Fc, la numérotation étant celle de l'index EU ou équivalent dans Kabat.
5
2. Procédé de production d'un variant d'un polypeptide parent comprenant un fragment Fc, ledit variant présentant une sialylation améliorée dudit fragment Fc par rapport à la sialylation du fragment Fc du polypeptide parent, qui comprend une étape de mutation d'au moins un acide aminé choisi parmi les acides aminés en position 240 à 243, 258 à 267 et 290 à 305 dudit fragment Fc, la numérotation étant celle de l'index EU ou équivalent dans Kabat.
10
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la sialylation dudit fragment Fc est augmentée d'au moins 10%, de préférence au moins 15%, de préférence au moins 20%, de préférence au moins 25%, de préférence au moins 30%, de préférence au moins 35%, de préférence au moins 40%, de préférence au moins 45%, de préférence au moins 50%, de préférence au moins 55%, de préférence au moins 60%, de préférence au moins 65%, de préférence au moins 70%, de préférence au moins 75%, de préférence au moins 80%, de préférence au moins 85%, de préférence au moins 90%, de préférence au moins 95%, par rapport à la sialylation dudit fragment Fc avant l'étape de mutation ou dudit fragment Fc du polypeptide parent.
15
20
4. Procédé de production d'un variant d'un polypeptide parent comprenant un fragment Fc, ledit variant présentant au moins une activité effectrice médiée par ledit fragment Fc diminuée par rapport à l'activité effectrice du polypeptide parent, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de mutation d'au moins un acide aminé choisi parmi les acides aminés en position 240 à 243, 258 à 267 et 290 à 305 dudit fragment Fc, la numérotation étant celle de l'index EU ou équivalent dans Kabat.
25
30

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'activité effectrice médiée par le fragment Fc est sélectionnée parmi la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) et la phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP).

5

6. Procédé selon la revendication 4 ou 5, caractérisé en ce que le variant est dépourvu de toute activité effectrice médiée par le fragment Fc.

7. Procédé de production d'un variant d'un polypeptide parent comprenant un fragment Fc, ledit variant présentant une affinité médiée par ledit fragment Fc diminuée par rapport à l'affinité du polypeptide parent, pour au moins un des récepteurs de la région Fc (FcR), de préférence choisi parmi le complément C1q et les récepteurs FcγRIIIa (CD16a), FcγRIIa (CD32a), et FcγRIIb (CD32b), et caractérisé en ce qu'il comprend une étape de mutation d'au moins un acide aminé choisi parmi les acides aminés en position 240 à 243, 258 à 267 et 290 à 305 dudit fragment Fc, la numérotation étant celle de l'index EU ou équivalent dans Kabat.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le variant présente une affinité médiée par ledit fragment Fc diminuée par rapport à l'affinité du polypeptide parent, pour le récepteur FcγRIIIa (CD16a) et le récepteur FcγRIIa (CD32a).

9. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la mutation est choisie parmi une insertion, une substitution, de préférence ponctuelle, et une délétion.

25

10. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la mutation est effectuée sur au moins un acide aminé situé en position 240, 241, 242, 243, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304 ou 305, la numérotation étant celle de l'index EU ou équivalent dans Kabat.

30

11. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la mutation est effectuée sur au moins un acide aminé situé en position 240, 241, 242, 243, 258, 259, 260, 261, 263, 265, 266, 267, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304 ou 305.

5

12. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la mutation est effectuée sur l'acide aminé situé en position 293 ou 294, la numérotation étant celle de l'index EU ou équivalent dans Kabat.

10 13. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le fragment Fc du polypeptide parent comprend déjà au moins une mutation additionnelle, de préférence choisie parmi P230S, T256N, V259I, N315D, A330V, N361D, A378V, S383N, M428L, N434Y, de préférence une combinaison de mutations additionnelles choisie parmi P230S/N315D/M428L/N434Y, T256N/A378V/S383N/N434Y,
15 V259I/N315D/N434Y et N315D/A330V/N361D/A378V/N434Y.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 13, caractérisé en ce que le polypeptide parent consiste en un fragment Fc.

20 15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 13, caractérisé en ce que le polypeptide parent consiste en une séquence d'acides aminés fusionnée en N- ou C-terminal à un fragment Fc.

16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 13, caractérisé en ce que ledit
25 polypeptide parent est une immunoglobuline ou un anticorps.

17. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le fragment Fc du polypeptide parent est un fragment Fc d'une IgG1, de préférence correspondant à la séquence SEQ ID NO : 1.

30

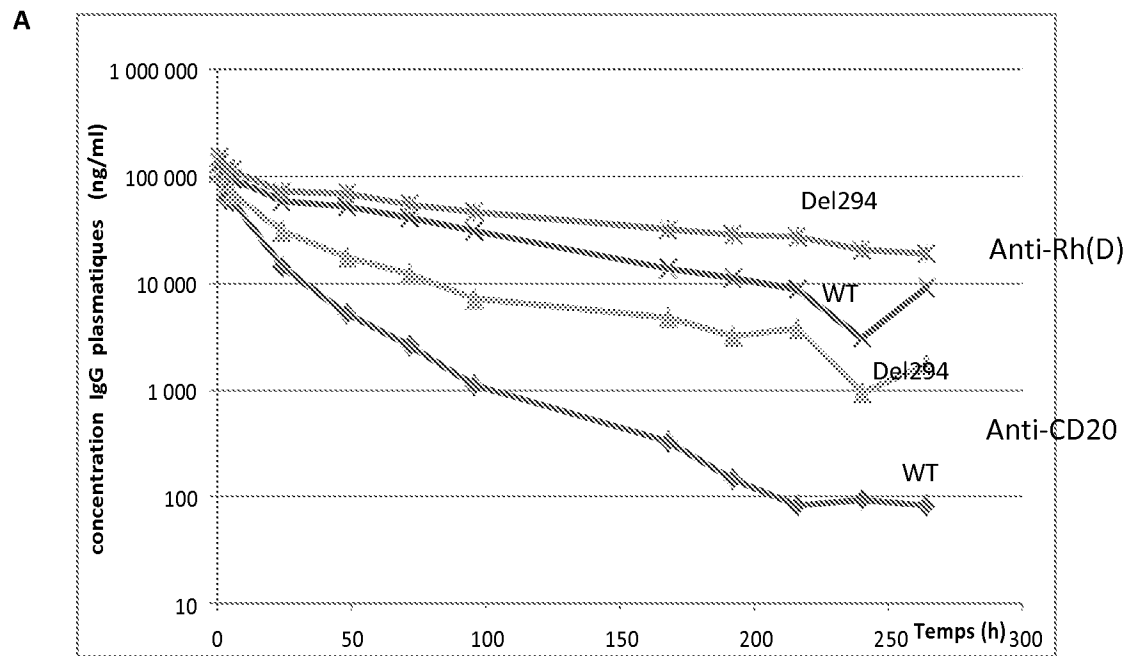
18. Procédé selon l'une des revendications 2 à 17, caractérisé en ce que l'étape de mutation est obtenue comme suit :

- i) on fournit une séquence nucléique codant pour le polypeptide parent comprenant le fragment Fc ;
- ii) on modifie la séquence nucléique fournie en i) pour obtenir une séquence nucléique codant pour le variant ; et
- 5 iii) on exprime la séquence nucléique obtenue en ii) dans une cellule hôte, et on récupère le variant.

FIGURES

		226
		→
IgG1m(1,17)	EPKSCDK--THT-----	-CPPCPAFEL
IgG1m(3)	EPKSCDK--THT-----	-CPPCPAFEL
IgG2	ERKCCVE-----	-CPPCPAFEL
IgG3	ELKTPLGDTTHTCPRCPPEPKSCLTPPPCFRCPEPKSCDTFFPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAFEL	
IgG4	ESKYG-----	-PPCPSCPAEE
IgG1m(1,17)	LGGEQVFLFPPKPKITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY	
IgG1m(3)	LGGEQVFLFPPKPKITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY	
IgG2	-AGPSVFLFPPKPKITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF	
IgG3	LGGEQVFLFPPKPKITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF	
IgG4	LGGEQVFLFPPKPKITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY	
IgG1m(1,17)	RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT	
IgG1m(3)	RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLT	
IgG2	RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLT	
IgG3	RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLT	
IgG4	RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLT	
IgGm(1,17)	CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL	
IgG1m(3)	CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL	
IgG2	CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL	
IgG3	CLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL	
IgG4	CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL	
IgG1m(1,17)	HNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO :6
IgG1m(3)	HNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO :10
IgG2	HNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO :7
IgG3	HNRYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO:8
IgG4	HNHYTQKSLSLSLGK	SEQ ID NO:9

Figure 1



B

Demi-vie (en heures)	
Anti-CD20	
WT	29,2
Del294	48,8 (x 1,7)
Anti-Rh(D)	
WT	65,7
Del294	111 (x 1,7)

Figure 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2015/052123

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K19/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2 537 864 A1 (LFB BIOTECHNOLOGIES [FR]; MILLEGEN [FR]) 26 December 2012 (2012-12-26) résumé, [0016] - [0018], [0025] - [0026], [0108] - [0112], exemples et revendications -----	1-18
X	WO 2005/063808 A1 (MERCK PATENT GMBH [DE]; GILLIES STEPHEN D [US]; LAUDER SCOTT [US]) 14 July 2005 (2005-07-14) résumé, p. 5 ligne 6 - p. 12 ligne 32, p. 15 ligne 18 - p. 22 ligne 23, p. 23 ligne 4 - p. 27 ligne 24p. 30 ligne 4 - p. 34 ligne 5, exemples 1-8, revendication 21-25 ----- -/--	1-18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 October 2015

Date of mailing of the international search report

30/10/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hermann, Patrice

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2015/052123

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/005786 A2 (CENTOCOR INC [US]; CAI ANN [US]; NGO CAM [US]; RAJU T SHANTHA [US]; SC) 11 January 2007 (2007-01-11) résumé, p. 5 ligne 3 - p. 6 ligne 6, p. 11 ligne 26 - p. 18 ligne 22, p. 23 ligne 7 - p. 37 ligne 16, exemples et revendications -----	1-18
A	US 2011/263828 A1 (WONG CHI-HUEY [US] ET AL) 27 October 2011 (2011-10-27) the whole document -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2015/052123

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2537864	A1	26-12-2012	CA 2840127 A1 27-12-2012
			CN 103827142 A 28-05-2014
			EP 2537864 A1 26-12-2012
			EP 2723770 A2 30-04-2014
			JP 2014519836 A 21-08-2014
			US 2014378663 A1 25-12-2014
			WO 2012175751 A2 27-12-2012

WO 2005063808	A1	14-07-2005	AU 2004309063 A1 14-07-2005
			BR PI0417916 A 10-04-2007
			CA 2551916 A1 14-07-2005
			CN 1902222 A 24-01-2007
			DK 1699821 T3 16-07-2012
			EP 1699821 A1 13-09-2006
			ES 2387028 T3 12-09-2012
			JP 2008504008 A 14-02-2008
			JP 2012107042 A 07-06-2012
			KR 20060124656 A 05-12-2006
			PT 1699821 E 23-08-2012
			RU 2370276 C2 20-10-2009
			US 2005192211 A1 01-09-2005
			US 2009092607 A1 09-04-2009
			WO 2005063808 A1 14-07-2005

WO 2007005786	A2	11-01-2007	AU 2006265676 A1 11-01-2007
			CA 2614046 A1 11-01-2007
			CN 101506238 A 12-08-2009
			DK 1896071 T3 26-05-2015
			EP 1896071 A2 12-03-2008
			ES 2543685 T3 21-08-2015
			IL 188420 A 24-09-2015
			JP 2009504569 A 05-02-2009
			PT 1896071 E 09-07-2015
			SG 163548 A1 30-08-2010
			WO 2007005786 A2 11-01-2007

US 2011263828	A1	27-10-2011	NONE

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. C07K19/00
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 2 537 864 A1 (LFB BIOTECHNOLOGIES [FR]; MILLEGEN [FR]) 26 décembre 2012 (2012-12-26) résumé, [0016] - [0018], [0025] - [0026], [0108] - [0112], exemples et revendications -----	1-18
X	WO 2005/063808 A1 (MERCK PATENT GMBH [DE]; GILLIES STEPHEN D [US]; LAUDER SCOTT [US]) 14 juillet 2005 (2005-07-14) résumé, p. 5 ligne 6 - p. 12 ligne 32, p. 15 ligne 18 - p. 22 ligne 23, p. 23 ligne 4 - p. 27 ligne 24p. 30 ligne 4 - p. 34 ligne 5, exemples 1-8, revendication 21-25 ----- -/-	1-18



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 octobre 2015

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

30/10/2015

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hermann, Patrice

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2007/005786 A2 (CENTOCOR INC [US]; CAI ANN [US]; NGO CAM [US]; RAJU T SHANTHA [US]; SC) 11 janvier 2007 (2007-01-11) résumé, p. 5 ligne 3 - p. 6 ligne 6, p. 11 ligne 26 - p. 18 ligne 22, p. 23 ligne 7 - p. 37 ligne 16, exemples et revendications -----	1-18
A	US 2011/263828 A1 (WONG CHI-HUEY [US] ET AL) 27 octobre 2011 (2011-10-27) le document en entier -----	1-18

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2015/052123

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 2537864	A1	26-12-2012	CA 2840127 A1	27-12-2012
			CN 103827142 A	28-05-2014
			EP 2537864 A1	26-12-2012
			EP 2723770 A2	30-04-2014
			JP 2014519836 A	21-08-2014
			US 2014378663 A1	25-12-2014
			WO 2012175751 A2	27-12-2012

WO 2005063808	A1	14-07-2005	AU 2004309063 A1	14-07-2005
			BR PI0417916 A	10-04-2007
			CA 2551916 A1	14-07-2005
			CN 1902222 A	24-01-2007
			DK 1699821 T3	16-07-2012
			EP 1699821 A1	13-09-2006
			ES 2387028 T3	12-09-2012
			JP 2008504008 A	14-02-2008
			JP 2012107042 A	07-06-2012
			KR 20060124656 A	05-12-2006
			PT 1699821 E	23-08-2012
			RU 2370276 C2	20-10-2009
			US 2005192211 A1	01-09-2005
			US 2009092607 A1	09-04-2009
			WO 2005063808 A1	14-07-2005

WO 2007005786	A2	11-01-2007	AU 2006265676 A1	11-01-2007
			CA 2614046 A1	11-01-2007
			CN 101506238 A	12-08-2009
			DK 1896071 T3	26-05-2015
			EP 1896071 A2	12-03-2008
			ES 2543685 T3	21-08-2015
			IL 188420 A	24-09-2015
			JP 2009504569 A	05-02-2009
			PT 1896071 E	09-07-2015
			SG 163548 A1	30-08-2010
			WO 2007005786 A2	11-01-2007

US 2011263828	A1	27-10-2011	AUCUN	
