

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

11 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

3 025 517

21 N° d'enregistrement national : 14 58469

51 Int Cl⁸ : C 07 K 16/26 (2016.01), A 61 K 39/395, 38/24, A 61 P 5/06, 5/24, 15/08

12 DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 10.09.14.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la demande : 11.03.16 Bulletin 16/10.

56 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

60 Références à d'autres documents nationaux apparentés : vision demandée le 31/08/15 bénéficiant de la date de dépôt du 10/09/14 de la demande initiale n° 14 1458469.

Demande(s) d'extension :

71 Demandeur(s) : REPROPHARM Société anonyme — FR.

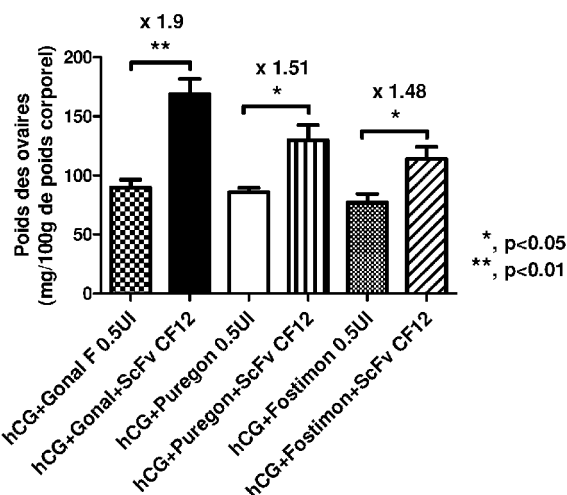
72 Inventeur(s) : KARA ELODIE, DECOURTYE JEREMYE, CASTERET SOPHIE et MAUREL MARIE-CHRISTINE.

73 Titulaire(s) : REPROPHARM Société anonyme.

74 Mandataire(s) : NOVAGRAAF TECHNOLOGIES.

54 LIGANDS POTENTIALISANTS DE LA BIOACTIVITE DES GONADOTROPHINES.

57 La présente invention se rapporte à des anticorps dirigés contre l'hormone folliculo-stimulante (FSH) capables de potentialiser la bioactivité des gonadotrophines.



FR 3 025 517 - A1



LIGANDS POTENTIALISANTS DE LA BIOACTIVITE DES GONADOTROPHINES

DESCRIPTION

5

Domaine technique

La présente invention se rapporte à des anticorps dirigés contre l'hormone folliculo-stimulante (FSH) capables de potentialiser la bioactivité des gonadotrophines.

10

La présente invention trouve ses applications principalement en médecine humaine et vétérinaire, pour induire l'ovulation chez un mammifère femelle.

Dans la description ci-dessous, les références entre crochets ([]) renvoient à la liste des références présentée à la fin du texte.

15

Etat de la technique

Les gonadotrophines (ou gonadotropines) sont des hormones glycoprotéiques complexes jouant un rôle central dans la régulation de la reproduction chez les vertébrés en agissant sur les fonctions des gonades (ovaires et testicules). Deux de ces hormones sont sécrétées chez tous les vertébrés : l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH). Chez deux groupes de mammifères, équidés et primates, il existe en outre une gonadotrophine chorionique (CG) sécrétée par le placenta : la choriogonadotropine humaine (hCG) et la choriogonadotropine équine (eCG) qui agissent toutes deux via des récepteurs LH.

25

L'hormone lutéinisante (LH) est produite par les cellules gonadotropes du lobe antérieur de l'hypophyse sous stimulation de la GnRH, elle-même produite par l'hypothalamus. La LH stimule la production de testostérone chez les mâles, tandis qu'elle intervient dans les modifications du cycle ovarien chez les femelles où elle est responsable de la croissance folliculaire terminale et de l'ovulation puis de la transformation du follicule ovulatoire rompu en corps jaune. Pendant la phase lutéale du cycle menstruel, la LH stimule la sécrétion de progestérone par le corps jaune, indispensable au développement précoce et à l'implantation de l'embryon. La LH est constituée d'une sous-unité α commune à toutes les hormones glycoprotéiques d'une même espèce (comme la FSH, la CG et l'hormone thyroïdostimulante, la TSH) et d'une sous-unité β responsable de la

35

spécificité d'activité de l'hormone ; activité qui n'existe que si les deux sous-unités sont associées de manière non covalente sous-forme d'un dimère.

L'hormone folliculo-stimulante (ou FSH) est produite par l'anté-hypophyse sous stimulation de la GnRH produite par l'hypothalamus. Chez les mâles, elle stimule les cellules de Sertoli indispensables à la spermatogénèse. Chez les femelles, elle est responsable du recrutement des follicules primordiaux, immatures, de leur croissance et de leur différenciation en follicules pré-ovulatoires en stimulant les récepteurs FSH des cellules de la granulosa. La FSH est constituée de deux sous-unités α et β , et a une structure semblable à celle de la LH. Seul le dimère est capable de stimuler les récepteurs FSH.

Chez les femelles, les taux de LH et de FSH sont cycliques : très faibles en période de repos sexuel ou en dehors de la période ovulatoire, avec un pic de sécrétion en période préovulatoire.

Les gonadotrophines sont utilisées en médecine vétérinaire et humaine, pour induire l'ovulation chez les mammifères femelles. Bien qu'efficaces, ces traitements présentent un risque sanitaire du fait de l'utilisation d'hormones extraites à partir de fluides biologiques (sang, urine) ou de tissus (hypophyses), particulièrement dans le domaine vétérinaire. C'est le cas de la chorionic gonadotropine équine (eCG) extraite à partir de sang de juments gravides, et de la LH et FSH porcines extraites à partir d'hypophyses de porc. Dans le domaine vétérinaire, on utilise également une hCG extraite à partir d'urine de femmes enceintes, le Chorulon® (Laboratoire MSD).

Dans le domaine de la clinique humaine, et particulièrement de la Procréation Médicalement Assistée (ou PMA), on utilise des hormones extraites à partir d'urine de femmes ménopausées telles que Fostimon® (Laboratoire Génévrier) qui est une FSH purifiée et Menopur® (Laboratoire Ferring Pharmaceuticals) qui est une hMG (human menopausal gonadotropin), mélange de FSH et de LH et la Gonadotropine Chorionique Endo5000 qui est une hCG purifiée (Laboratoire Schering-Plough). On utilise également des FSH humaines recombinantes, telles que Gonal-F® (Laboratoire Merck Serono) et Puregon® (Laboratoire Merck Schering-Plough); des hCG et LH recombinantes telle que Ovidrel® et Luveris® (Laboratoire Merck Serono).

En outre l'usage répété de ces hormones induit le plus souvent une réaction immunitaire qui vient neutraliser l'effet des hormones conduisant ainsi à une baisse d'efficacité thérapeutique. Cependant, il a également été mis en évidence

dans quelques cas que la réaction immunitaire pouvait produire des anticorps capables de potentialiser l'activité de l'hormone lorsqu'elle était co-administrée (Brevet EP 1518863) [1]. Depuis, il a également été mis en évidence trois anticorps monoclonaux anti-LH capables de potentialiser son action ainsi que celle de la FSH pour deux d'entre eux (Demande Internationale WO 2012/066519) [2].

Description de l'invention

Les Inventeurs ont maintenant obtenu des anticorps monoclonaux produits contre la sous-unité β de la FSH, capables de potentialiser son action ainsi que celle de la LH et de la hCG.

Ces anticorps monoclonaux sont respectivement dénommés CA5, CH10 et CF12.

L'hybridome qui a produit l'anticorps CA5 a été déposé conformément au Traité de Budapest, le 03/10/2013 auprès de la CNCM (Collection Nationale de Culture de Microorganismes, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France), sous le numéro CNCM I-4801.

L'hybridome qui a produit l'anticorps CH10 a été déposé conformément au Traité de Budapest, le 03/10/2013 auprès de la CNCM (Collection Nationale de Culture de Microorganismes, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France), sous le numéro CNCM I-4802.

L'hybridome qui a produit l'anticorps CF12 a été déposé conformément au Traité de Budapest, le 03/10/2013 auprès de la CNCM (Collection Nationale de Culture de Microorganismes, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France), sous le numéro CNCM I-4803.

Les séquences nucléotidiques des régions variables des chaînes lourdes et légères des anticorps CA5, CH10 et CF12 ont été déterminées, les séquences peptidiques correspondantes déduites. Elles sont présentées respectivement dans les tableaux 1 à 3 ci-dessous.

Tableau 1

Anticorps monoclonal CA5	
Chaîne lourde (VH)	
Séquence nucléotidique (SEQ ID NO : 1)	GAGGTGAAGCTGGTGAATCTGGAGGAGGCTTGGTACAGCCT GGGGGTTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAACTTCTGGGTTACCTT CAGTGATTTCTACATGGAGTGGGTCCGCCAGCCTCCAGGGAAG

	AGACTGGAGTGGATTGCTGCAAGTAGAAACAAAGCTAAGGATT ATACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCCGGTTCATCGT CTCCAGAGACACTTCCCAAAGCATCCTCTACCTTCAGATGAATG CCCTGAGAGCTGAGGACACTGCCATTTATTTCTGTGCAAGAGAT GCAAGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCT CTGCA
Séquence peptidique (SEQ ID NO : 2)	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWWRQPPGKR LEWIAASRNKAKDYTTEYSASVKGRFIVSRDTSQSILYLQMNALRA EDTAIFYCARDARFAYWGQGLVTVSA
Chaîne légère (VL)	
Séquence nucléotidique (SEQ ID NO : 3)	GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGT TGGAGAGAAGATTACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTT TATATAGTAGCAATCAAAAGAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAG AAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATTTACTGGGCATCCAC TAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCT GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAG ACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGCTATCCTCGG ACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA
Séquence peptidique (SEQ ID NO : 4)	DIVMSQSPSSLAVSVGEKITMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQK PGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAV YYCQQYYSPRTFGGGTKLEIK

Tableau 2

Anticorps monoclonal CH10	
Chaîne lourde (VH)	
Séquence nucléotidique (SEQ ID NO : 5)	GAGGTGCAGCTTGTTGAGTCTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTA AAGGGTCATTGAAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTC AATACCTACGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGG GTTTGAATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAAAGTAATAATTAT GCAACATATTATGCCGATTCAGTGAAAGACAGGTTCCACCATCTC CAGAGATGATTCACAAAGCATGCTCTATCTGCAAATGAACAACT TGAAAACTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGTGAGACAGGAT TACTACGGTAGTAGCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCA CTCTCACAGTCTCCTCA
Séquence	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNQYAMNWRQAPGKG

peptidique (SEQ ID NO : 6)	LEWWARIRSKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSMLYLQMNNLK TEDTAMYYCVRQDYYGSSYFDYWGGTTLTVSS
Chaîne légère (VL)	
Séquence nucléotidique (SEQ ID NO : 7)	GACATTGTGATGACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCC AGGAGATAGAGTCTCTCTTTCTGCAGGGCCAGCCAGAGTATT AGCGACTACTTACACTGGTATCAACAAAAATCACATGAGTCTCC AAGGCTTCTCATCAAATATGCTTCCCAATCCATCTCTGGGATCC CCTCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGTCAGATTTCACTCT CAGTATCAACAGTGTGGAACCTGAAGATGTTGGAGTGATTACT GTCAAAATGGTCACAGCTTTCCGTACACGTTCCGGAGGGGGGAC CAAGCTGGAAATAAAA
Séquence peptidique (SEQ ID NO : 8)	DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSI SYDLHWYQQKSHESPR LLIKYASQSI SGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVVYQCNG HSFPYTFGGGTKLEIK

Tableau 3

Anticorps monoclonal CF12	
Chaîne lourde (VH)	
Séquence nucléotidique (SEQ ID NO : 9)	CAGGGTCAGATGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTGAAGCCT GGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGACTTCTGGCTTCACCT TCAGCAGTAGCTATATAAGTTGGTTGAAGCAAAAGCCTGGACAG AGTCTTGAGTGGATTGCATGGATTTATGCTGGAAGTGGTGGTAC TAGCTATAATCAGAAGTTCACAGGCAAGGCCCAACTGACTGTAG ACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAATTCAGCAGCCTGAC AACTGAGGACTCTGCCATCTATTACTGTGCAAGACACGGGTCCT ACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTC A
Séquence peptidique (SEQ ID NO : 10)	QGQMQQSGAELVKPGASVKLSCKTSGFTFSSSYISWLKQKPGQS LEWIAWIYAGTGGTSYNQKFTGKAQLTVDTSSTAYMQFSSLTTE DSAIYYCARHGSYFDYWGGTTLTVSS
Chaîne légère (VL)	
Séquence nucléotidique (SEQ ID NO : 11)	GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCT AGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGT GATTATGATGGTGATAGTTATATGAACTGGTACCAACAGAAACC

	AGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATGCTGCATCCAATCTAG AATCTGGGATCCCAGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGAC AGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCT GCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCGTACACGTT CGGAGGGGGGACCAAGCTGGAATAAAA
Séquence peptidique (SEQ ID NO : 12)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGD SYMNWYQQKPG QPPKLLIYAASNLESGIPARFSGSGSDFTLNHPVEEEDAATYYC QQSNEDPYTFGGGTKLEIK

5 Les séquences codant pour les CDRs (régions déterminant la complémentarité) ont été déterminées à partir des séquences des régions variables des chaînes lourdes (VH-CDR) et légères (VL-CDR) des anticorps CA5, CH10 et CF12 ci-dessus. Les séquences peptidiques correspondantes ont été déduites, et sont présentées respectivement dans les tableaux 4 à 6 ci-dessous.

Tableau 4

Anticorps monoclonal CA5	
VH-CDR1 (SEQ ID NO : 13)	GFTFSDFY
VH-CDR2 (SEQ ID NO : 14)	SRNKAKDYTT
VH-CDR3 (SEQ ID NO : 15)	ARDARFAY
VL-CDR1 (SEQ ID NO : 16)	QSLLYSSNQKNY
VL-CDR2	WAS
VL-CDR3 (SEQ ID NO : 17)	QQYYSYPRT

Tableau 5

Anticorps monoclonal CH10	
VH-CDR1 (SEQ ID NO : 18)	GFTFNTYA
VH-CDR2 (SEQ ID NO : 19)	IRSKSNNYAT
VH-CDR3 (SEQ ID NO : 20)	VRQDYYGSSYFDY
VL-CDR1 (SEQ ID NO : 21)	QSIDY
VL-CDR2	YAS
VL-CDR3 (SEQ ID NO : 22)	QNGHSFPYT

Tableau 6

Anticorps monoclonal CF12	
VH-CDR1 (SEQ ID NO : 23)	GFTFSSSY
VH-CDR2 (SEQ ID NO : 24)	IYAGTGGT
VH-CDR3 (SEQ ID NO : 25)	ARHGSYFDY

VL-CDR1 (SEQ ID NO : 26)	QSVDYDGDSY
VL-CDR2	AAS
VL-CDR3 (SEQ ID NO : 27)	QQSNEDPYT

La présente invention a pour objet un ligand de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) potentialisant la bioactivité de la FSH, de l'hormone lutéinisante (LH) et de la gonadotropine chorionique (CG), caractérisé en ce qu'il comprend le paratope d'un anticorps anti-sous-unité β de la FSH.

5 On entend par « anticorps anti-sous-unité β de la FSH » au sens de la présente invention, tout anticorps obtenu par immunisation d'un animal à partir de premières injections de FSH suivies de plusieurs rappels avec injection de la sous-unité β de la FSH. Les injections peuvent être réalisées à partir de FSH de différents mammifères, par exemple de FSH ovine, humaine, bovine, caprine ou
10 porcine, équine, canine, murine etc... et des sous-unités β de la FSH d'origine homologue ou hétérologue. Ainsi les anticorps monoclonaux CA5 et CH10 ont été obtenus suite à une immunisation à partir de FSH ovine et de sous-unité β de la FSH ovine, alors que l'anticorps monoclonal CF12 a été obtenu suite à une immunisation à partir de FSH humaine et de sous-unité β de la FSH humaine.

15 En particulier, la présente invention a donc pour objet un ligand selon l'invention, caractérisé en ce que :

le domaine variable de la chaîne lourde contient les CDRs suivants :

- VH-CDR1, défini par la séquence GFTFSDFY (SEQ ID NO : 13) ;
- VH-CDR2, défini par la séquence SRNKAKDYTT (SEQ ID NO : 14) ;
- 20 - VH-CDR3, défini par la séquence ARDARFAY (SEQ ID NO : 15) ; et

le domaine variable de la chaîne légère contient les CDRs suivants :

- VL-CDR1, défini par la séquence QSLLYSSNQKNY (SEQ ID NO : 16) ;
- VL-CDR2, défini par la séquence WAS ;
- VL-CDR3, défini par la séquence QQYYSPRT (SEQ ID NO : 17).

25 En particulier, la présente invention a donc pour objet un ligand selon l'invention, caractérisé en ce que :

le domaine variable de la chaîne lourde contient les CDRs suivants :

- VH-CDR1, défini par la séquence GFTFNTYA (SEQ ID NO : 18) ;
- VH-CDR2, défini par la séquence IRSKSNYYAT (SEQ ID NO : 19) ;
- 30 - VH-CDR3, défini par la séquence VRQDYGGSSYFDY (SEQ ID NO : 20) ; et

le domaine variable de la chaîne légère contient les CDRs suivants :

- VL-CDR1, défini par la séquence QSISDY (SEQ ID NO : 21) ;

- VL-CDR2, défini par la séquence YAS ;
- VL-CDR3, défini par la séquence QNGHSFPYT (SEQ ID NO : 22).

En particulier, la présente invention a donc pour objet un ligand selon l'invention, caractérisé en ce que :

- 5 le domaine variable de la chaîne lourde contient les CDRs suivants :
- VH-CDR1, défini par la séquence GFTFSSSY (SEQ ID NO : 23) ;
 - VH-CDR2, défini par la séquence IYAGTGGT (SEQ ID NO : 24) ;
 - VH-CDR3, défini par la séquence ARHGSYFDY (SEQ ID NO : 25) ; et
- le domaine variable de la chaîne légère contient les CDRs suivants :
- 10 - VL-CDR1, défini par la séquence QSVDYDGDSY (SEQ ID NO : 26) ;
- VL-CDR2, défini par la séquence AAS ;
 - VL-CDR3, défini par la séquence QQSNEDPYT (SEQ ID NO : 27).

On entend par « CDR » au sens de la présente invention, les trois régions hypervariables des régions variables des chaînes lourdes et légères d'un anticorps qui constituent les éléments du paratope et permettent de déterminer la complémentarité de l'anticorps avec l'épitope de l'antigène. Ces trois régions hypervariables sont encadrées par quatre régions constantes qui constituent la « charpente » (FR ou framework regions) et donnent une configuration stable au domaine variable.

15

20 Un ligand selon la présente invention est par exemple :

- l'anticorps monoclonal CA5 produit par l'hybridome CNCM I-4801 ;
 - l'anticorps monoclonal CH10 produit par l'hybridome CNCM I-4802 ;
 - l'anticorps monoclonal CF12 produit par l'hybridome CNCM I-4803 ;
 - un fragment Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, dsFv ou scFv, un nanobody d'un anticorps
- 25 ci-dessus. De préférence, il s'agit d'un fragment Fab ou d'un fragment scFv ;
- une forme bi-, tri- ou tétravalente (diabodies, triabodies, tétrabodies) de deux, trois ou quatre fragments de scFv, respectivement ;
 - un anticorps recombinant comprenant le paratope d'un anticorps ci-dessus et dont les régions constantes ont été modifiées de sorte à minimiser
- 30 l'immunogénicité vis-à-vis de l'animal ou de l'homme auquel il est destiné. Par exemple, il s'agit d'un anticorps chimérique (humanisé, ovinisé, caprinisé, bovinisé, porcisé etc...) ou entièrement humanisé, ovinisé, caprinisé, bovinisé, porcisé

A titre d'exemple non limitatif, les séquences nucléotidiques de scFv dérivés des anticorps CA5, CH10 et CF12 ont été déterminées, les séquences

35

peptidiques correspondantes déduites, et sont présentées respectivement dans les tableaux 7 à 9 ci-dessous.

Tableau 7

scFv CA5	
Séquence nucléotidique (SEQ ID NO : 28)	CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGCGGCGGCCTGGTACAACCT GGTGGCTCACTGCGCCTGAGCTGCGCAACCAGCGGTTTTACCT TTAGCGATTTCTACATGGAATGGGTTTCGCCAACCGCCGGGTAA GCGTCTGGAATGGATCGCGGCGAGCCGTAACAAGGCGAAAGA TTATACCACTGAATATAGCGCGTCGGTCAAAGGTCGCTTCATTG TCTCGCGGATAACCAGCCAGTCGATTCTGTATCTGCAAATGAAT GCCCTGCGTGCCGAAGACACGGCCATCTACTTCTGTGCGCGTG ATGCACGCTTTGCCTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACCGT TAGCGCCGGTGGTGGCGGTTTCAGGTGGTGGCGGTAGCGGTGG CGGTGGCTCAGATATTCAGATGACCCAGACCCCGTCAAGCCTG GCGGTGTCAGTCGGCGAAGAGATTACTATGAGCTGTAAAAGCT CGCAGAGCCTGCTGTACTCATCGAACCAGAAAAATTACCTGGC ATGGTATCAACAGAAGCCGGGTCAGTCGCCGAAACTGCTGATC TACTGGGCCTCAACCCGTGAGAGCGGCGTACCGGATCGCTTTA CTGGCAGCGGCAGCGGCACGGACTTTACGCTGACGATTAGCTC GGTGAAGGCCGAAGACCTGGCGGTTTATTATTGCCAACAGTAC TATAGCTACCCTCGTACCTTCGGCGGCGGCACGAAACTCGAGA TTAAACATCACCATCACCATCACTAACTCGAGATCAAGTAA
Séquence peptidique (SEQ ID NO 29)	QVQLQQSGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWRQPPGK RLEWIAASRNKAKDYTTEYSASVKGRFIVSRDTSQSILYLQMNALR AEDTAIFYCARDARFAYWGQGLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGS DIQMTQTPSSLAVSVGEEITMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQK PGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTLSVKAEDLAV YYCQQYYSPRTFGGGTKLEIKHHHHHH

Tableau 8

scFv CH10	
Séquence nucléotidique (SEQ ID NO : 30)	CAGGTGCAGCTGCAGCAATCAGGCGGCGGCCTGGTCCAACCG AAAGGTAGCCTGAAACTGTCGTGCGCCGCCAGCGGCTTTACGT TCAACACTTACCGATGAATTGGGTGCGTCAGGCGCCTGGTAA AGGCCTGGAATGGGTGGCACGCATCCGTTCAAAAAGCAACAAT TACGCGACGTATTATGCAGACAGCGTAAAAGATCGCTTTACCAT

	<p>CAGCCGTGATGATTCACAGTCAATGCTGTACCTGCAAATGAATA ACCTGAAAACCTGAAGACACTGCGATGTATTATTGTGTTCCGCCAG GACTATTACGGTAGCTCGTATTTTCGATTACTGGGGCCAAGGCA CCACCCTGACGGTGAGCTCGGGTGGCGGTGGCTCAGGTGGTG GTGGTAGCGGCGGTGGCGGTAGCGATATCCAGATGACCCAGA CCCCGGCAACCCTGAGCGTTACCCCTGGTGACCGCGTTTCGCT GAGCTGCCGTGCCTCGCAGAGCATTTCGGACTATCTGCACTGG TATCAGCAAAAATCACACGAATCACCGCGTCTGCTGATTAAGTA CGCCAGCCAATCGATTAGCGGTATTCCGAGCCGCTTTTCGGGC TCGGGTTCGGGCTCGGATTTTACCCTGTCAATTAATAGCGTAGA GCCGGAAGATGTAGGCGTCTACTATTGTGAGAACGGCCATTCA TTCCCGTACACGTTTGGCGGCGGCACCAAGCTCGAGATTAAGC ATCACCATCATCACCATTAACCTCGAGATCAAGTAA</p>
<p>Séquence peptidique (SEQ ID NO 31)</p>	<p>QVQLQQSGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNTYAMNWRQAPGK GLEWWARIRSKSNYYATYYADSVKDRFTISRDDSQSMLYLQMNLL KTEDTAMYYCVRQDYGGSSYFDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGG SGGGGSDIQMTQTPATLSVTPGDRVSLSCRASQSISDYLHWYQQ KSHESPRLLIKYASQSIGIPSRFSGSGSGSDFTLINSVEPEDVGV YYCQNGHSFPYTFGGGKLEIKHHHHHH</p>

Tableau 9

scFv CF12	
<p>Séquence nucléotidique (SEQ ID NO : 32)</p>	<p>CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCGGGTGGCGCAGAGCTGGTAAA CCGGGTGCGAGCGTTAAACTGAGCTGCAAACTAGCGGCTTTA CCTTTAGCTCGTCATATATTTTCGTGGCTGAAGCAGAAACCGGGC CAGTCACTGGAATGGATTGCGTGGATCTACGCAGGCACGGGTG GCACCTCATATAATCAGAAATTCACCGGTAAGCGCAACTGACG GTCGATACCAGCAGCAGCACGGCGTACATGCAGTTCAGCTCGC TGACCACTGAAGATAGCGCAATCTACTATTGTGCACGCCATGGT TCGTACTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACCACCCTGACCGTTT CAAGCGGTGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTGGTTTCAGGTGGCG GCGGCTCAGATATTCAGATGACCCAGACCCTGCGAGCCTGGC AGTGTCAGTGGGCCAACGCGCAACCATCTCGTGTAAGCCTCG CAGAGCGTGGATTATGACGGCGATAGCTACATGAACTGGTATC AGCAAAAGCCTGGTCAACCGCCGAAGCTGCTGATTTACGCCGC CAGCAACCTGGAATCGGGCATCCCGGCCCGTTTTCAGCGGCTCA</p>

	GGCTCGGGTACTGACTTCACGCTGAACATTCACCCGGTAGAAG AAGAAGACGCGGCCACGTATTACTGCCAGCAAAGCAATGAAGA CCCGTACACTTTTGGCGGGCAGGACGAAACTCGAGATCAAACAC CATCACCATCACCATTAECTCGAGATCAAGTAA
Séquence peptidique (SEQ ID NO 33)	QVQLQQSGGAELVKPGASVKLSCKTSGFTFSSSYISWLKQKPGQS LEWIAWIYAGTGGTSYNQKFTGKAQLTVDTSSTAYMQFSSLTTE DSAIYYCARHGSDYWGQTTTLVSSGGGGSGGGGSGGGGSD IQMTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGSYMNWYQQKPG QPPKLLIYAASNLESGIPARFSGSGSDFTLNHPVEEEDAATYYC QQSNEDPYTFGGGTKLEIKHHHHH

La présente invention a également pour objet une séquence nucléotidique codant pour un ligand selon l'invention.

La présente invention a également pour objet un vecteur recombinant, en particulier un vecteur d'expression, comprenant une séquence nucléotidique selon l'invention.

La présente invention a également pour objet une cellule hôte comprenant une séquence nucléotidique selon l'invention ou un vecteur recombinant selon l'invention. Par exemple, il s'agit des hybridomes CNCM I-4801, CNCM I-4802 et CNCM I-4803 ou d'une cellule transformée par une séquence nucléotidique ou un vecteur recombinant selon l'invention.

La présente invention a également pour objet un procédé de production d'un ligand selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en culture dans un milieu approprié de cellules hôte selon l'invention, et la récupération dudit ligand à partir de ladite culture.

Les Inventeurs ont mis en évidence que l'anticorps CA5 potentialise fortement la FSH porcine, ovine, bovine et de façon moindre bien que significativement la FSH humaine, alors que l'anticorps CF12 potentialise peu bien que significativement la FSH porcine, ovine et bovine contrairement à la FSH humaine qu'il potentialise fortement. En outre, les Inventeurs ont mis en évidence que les scFv dérivés des anticorps CA5, CH10 et CF12, possèdent les mêmes propriétés de liaison et de potentialisation que les anticorps dont ils dérivent.

La présente invention a également pour objet un ligand selon l'invention pour une utilisation comme médicament, en particulier pour potentialiser la bioactivité de la FSH, de la LH, et de la gonadotropine chorionique (CG) pour induire l'ovulation chez un mammifère femelle et pour réduire les problèmes

d'infertilité ou d'hypofertilité hormono dépendants chez un mammifère mâle ou femelle.

La présente invention a également pour objet un complexe formé d'un ligand et d'une gonadotrophine, ou d'un peptide actif de celle-ci, capable de se
5 lier audit ligand et dont l'activité est potentialisée par ledit ligand. Par exemple, il s'agit du complexe d'un ligand avec la LH, avec l'hormone gonadotropine chorionique (CG), ou avec la FSH extraites de tissus ou de fluides biologiques, ou recombinantes, ou d'un peptide actif de celles-ci capable de se lier audit ligand et dont l'activité est potentialisée par ledit ligand.

10 La présente invention a également pour objet un ligand ou complexe selon l'invention pour utilisation comme médicament, en particulier pour potentialiser la bioactivité de la FSH, de la LH, et de la gonadotropine chorionique (CG) pour induire une ovulation voire une polyovulation chez un mammifère femelle ou pour réduire les problèmes d'infertilité ou d'hypofertilité hormono dépendants chez un
15 mammifère mâle ou femelle. Ledit médicament permet également d'augmenter le taux de progestérone endogène circulant sécrété par un ou plusieurs corps jaunes chez un mammifère femelle, favorisant ainsi le développement embryonnaire précoce et diminuant le risque d'avortement.

La présente invention a également pour objet un procédé de production
20 carnée, où ledit procédé comprend l'administration de ligand et/ou de complexe de l'invention à un mammifère femelle animal non humain.

La présente invention a également pour objet un ligand et/ou complexe de l'invention pour une utilisation dans le traitement de l'infertilité ou de l'hypofertilité hormono dépendante chez un mammifère. Dans le cas d'un mammifère femelle
25 souffrant d'infertilité ou d'hypofertilité, l'administration du ligand ou complexe de l'invention va permettre de stimuler une procréation naturelle, médicalement assistée ou artificielle. Il est à noter que l'administration du ligand ou complexe de l'invention à un mammifère femelle sain va également permettre de déclencher l'ovulation dans le cadre d'une procréation naturelle ou artificielle.

30 On entend par « infertilité/hypofertilité hormono dépendante » au sens de la présente invention, une infertilité/hypofertilité due à une insuffisance hormonale par exemple de faibles concentrations circulantes de FSH et LH ou une absence de ces hormones résultant par exemple d'une cause externe (par exemple les pesticides) ou interne (par exemple, insuffisance hypophysaire ou
35 hypothalamique ou d'un problème de réceptivité des gonades à la LH et/ou la

FSH due à une anomalie des récepteurs ou des gonadotropines LH, FSH, CG par exemple une mutation ou un polymorphisme des récepteurs).

Les ligands et complexes de l'invention peuvent être utilisés chez l'homme ou l'animal, en particulier les ovins, bovins, caprins, équins, porcins, murins, canins, camelins etc...

Les ligands, les hormones ou les complexes selon l'invention peuvent être administrés soit séparément, soit séquentiellement, soit conjointement, par injection, par exemple intramusculaire, intraveineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée, transcutanée, intradermique, intraorbitaire, intraoculaire, ophtalmique, ou par voie transoculaire, sans altérer leur effet potentialisant.

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant un ligand ou complexe de l'invention et un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Ladite composition pharmaceutique peut comprendre en outre une FSH et/ou une LH et/ou une hormone gonadotropine chorionique (CG).

D'autres avantages pourront encore apparaître à l'homme du métier à la lecture des exemples ci-dessous, illustrés par les figures annexées, donnés à titre illustratif.

20 **Brève description des figures**

- La figure 1 illustre l'effet potentialisant *in vitro* des anticorps monoclonaux CA5 (A) et CH10 (B) sur la bioactivité de la FSH ovine (oFSH), et de l'anticorps monoclonal CF12 (C) sur la bioactivité de la FSH humaine (hFSH) sur des cellules de granulosa bovines.
- 25 - La figure 2 représente l'effet potentialisant *in vitro* des anticorps monoclonaux CA5 (A) et CH10 (B) sur la bioactivité de la FSH ovine (oFSH), et de l'anticorps monoclonal CF12 (C) sur la bioactivité de la FSH humaine (hFSH) sur une lignée cellulaire HEK 293 transfectée de façon stable avec le récepteur FSH humain.
- La figure 3 représente l'effet potentialisant *in vitro* de l'anticorps monoclonal CA5
- 30 sur la bioactivité de la FSH ovine (oFSH) sur une lignée cellulaire HEK 293 transfectée de façon stable avec le récepteur FSH humain et le vecteur Glosensor®.
- La figure 4 représente l'effet potentialisant de l'anticorps monoclonal CA5 sur la bioactivité de la FSH porcine (pFSH) sur une lignée cellulaire HEK 293

transfectée de façon stable avec le récepteur FSH humain et le vecteur Glosensor®.

5 - La figure 5 représente l'effet potentialisant *in vitro* de l'anticorps monoclonal CA5 (A à E) et du scFv CA5 (F) sur la bioactivité de la FSH humaine (hFSH) sur une lignée cellulaire HEK 293 transfectée de façon stable avec le récepteur FSH humain et le vecteur Glosensor®.

10 - La figure 6 représente l'effet potentialisant *in vitro* de l'anticorps monoclonal CH10 sur la bioactivité de la FSH ovine (oFSH) sur une lignée cellulaire HEK 293 transfectée de façon stable avec le récepteur FSH humain et le vecteur Glosensor®.

- La figure 7 représente l'effet potentialisant de l'anticorps monoclonal CH10 sur la bioactivité de la FSH humaine (hFSH) *in vitro* sur une lignée cellulaire HEK 293 transfectée de façon stable avec le récepteur FSH humain et le vecteur Glosensor®.

15 - La figure 8 représente l'effet potentialisant *in vitro* de l'anticorps monoclonal CF12 sur la bioactivité de la FSH humaine (hFSH) sur une lignée cellulaire HEK 293 transfectée de façon stable avec le récepteur FSH humain et le vecteur Glosensor®.

20 - La figure 9 représente l'effet potentialisant *in vitro* de l'anticorps monoclonal CF12 et du scFv CF12 sur la bioactivité de la FSH humaine (hFSH) sur une lignée cellulaire HEK 293 transfectée de façon stable avec le récepteur FSH humain et le vecteur Glosensor®.

25 - La figure 10 représente l'effet potentialisant *in vitro* de l'anticorps monoclonal CF12 sur la bioactivité de la FSH ovine (oFSH) sur une lignée cellulaire HEK 293 transfectée de façon stable avec le récepteur FSH humain et le vecteur Glosensor®.

30 - La figure 11 représente l'effet potentialisant *in vitro* de l'anticorps monoclonal CF12 sur la bioactivité de la FSH porcine (pFSH) sur une lignée cellulaire HEK 293 transfectée de façon stable avec le récepteur FSH humain et le vecteur Glosensor®.

- La figure 12 représente l'effet potentialisant *in vitro* de l'anticorps monoclonal CF12 sur la bioactivité des FSH humaines (hFSH) Gonal-F® (B) et Fostimon® (C) sur des cellules de granulosa humaines.

- La figure 13 représente l'effet potentialisant *in vitro* de l'anticorps monoclonal CF12 sur la bioactivité de la FSH humaine (hFSH) Gonal-F® sur des cellules de granulosa humaines.
- La figure 14 représente l'effet potentialisant *in vivo* de l'anticorps monoclonal CA5 sur la bioactivité de la FSH ovine (oFSH) (A) et sur la bioactivité des FSH humaines (hFSH) Gonal-F®, Puregon® et Fostimon® (B) chez le rat femelle.
- La figure 15 représente l'effet potentialisant *in vivo* de l'anticorps monoclonal CA5 sur la bioactivité de la FSH humaine (hFSH) Gonal-F® (A) et l'effet potentialisant du scFv CA5 sur la bioactivité des FSH humaines (hFSH) Gonal-F® (A), Puregon® et Fostimon® (B) chez le rat femelle.
- La figure 16 représente l'effet potentialisant *in vivo* de l'anticorps monoclonal CH10 sur la bioactivité de la FSH ovine (oFSH) (A) et sur la bioactivité de la FSH humaine (hFSH) Gonal-F® (B) chez le rat femelle.
- La figure 17 représente l'effet potentialisant *in vivo* de l'anticorps monoclonal CH10 sur la bioactivité des FSH humaines (hFSH) Puregon® et Fostimon® (A) et l'effet potentialisant du scFv CH10 sur la bioactivité de la FSH humaine (hFSH) Gonal-F® (B) chez le rat femelle.
- La figure 18 représente l'effet potentialisant *in vivo* de l'anticorps monoclonal CF12 sur la bioactivité des FSH humaines (hFSH) Gonal-F®, Puregon® et Fostimon® (A) et de la FSH ovine (oFSH) (B) chez le rat femelle.
- La figure 19 représente l'effet potentialisant *in vivo* du scFv CF12 sur la bioactivité des FSH humaines (hFSH) Gonal-F® (A et B), Puregon® et Fostimon® (A) et de l'anticorps monoclonal CF12 sur la bioactivité de la FSH humaine (hFSH) Gonal-F selon différents modes d'administration (C) chez le rat femelle.

25

EXEMPLES

EXEMPLE 1 : OBTENTION DES LIGANDS DE L'INVENTION, ET LEUR CARACTERISATION

30

1/ Stratégie d'immunisation des souris

35

Les injections ont toutes été réalisées par voie intra-péritonéale sur des souris (Balb/C). Cinq souris ont été utilisées pour chaque stratégie d'immunisation.

Stratégie d'immunisation des souris pour l'anticorps CA5 et l'anticorps CH10

- Une première injection (J0) a été réalisée avec 100µg de FSH ovine purifiée avec adjuvant de Freund complet. Plusieurs injections de rappel ont été ensuite réalisées selon la séquence suivante :
- J21 et J44 : 100µg de FSH ovine purifiée avec adjuvant de Freund incomplet ;
 - J134 et J204 : 50µg de sous-unité bêta de FSH ovine avec adjuvant de Freund incomplet ;
 - J217, J218 et J219 : 30µg de sous-unité bêta de FSH ovine sans adjuvant ;
 - J220 : fusion.

Stratégie d'immunisation des souris pour l'anticorps CF12

- L'immunisation a été réalisée avec plusieurs injections de FSH humaine recombinante (hFSHr). Une première injection (J0) a été réalisée avec 50µg de hFSHr avec adjuvant de Freund complet. Plusieurs injections de rappel ont été ensuite réalisées selon la séquence suivante :
- J21 et J35 : injection de rappel de 50µg de hFSHr avec adjuvant de Freund incomplet ;
 - J55, J56 et J57 : injection de 30µg de sous-unité bêta de hFSHr sans adjuvant ;
 - J58 : fusion.

2/ Isotypage

- L'isotypage des anticorps CA5, CH10 et CF12 a été réalisé avec le kit d'isotypage FastElysa commercialisé par RD Biotech (référence RDB 3255) en suivant les recommandations du fabricant.

- L'anticorps CA5 est une immunoglobine de classe IgG2a et d'isotype Kappa. Les valeurs des densités optiques (DO) obtenues ont été 0,335 et 0,371 respectivement.

L'anticorps CH10 est une immunoglobine de classe IgM et d'isotype Kappa. Les valeurs des densités optiques (DO) obtenues ont été 0,2 et 0,124 respectivement.

L'anticorps CF12 est une immunoglobine de classe IgM et d'isotype Kappa. Les valeurs des densités optiques (DO) obtenues ont été 0,639 et 0,6 respectivement.

5 **3/ Séquencage**

Les séquences nucléotidiques de la partie variable des chaînes lourdes (VH) et légères (VL) des anticorps CA5, CH10, CF12 sécrétés par les hybridomes CNCM I-4801, CNCM I-4802 et CNCM I-4803, respectivement, ont été
10 déterminées à partir de leur ARN messager (ARNm) selon le protocole ci-après.

Les ARN ont été extraits des cellules à l'aide du kit Nucleospin® RNA (Macherey Nagel, Allemagne) en suivant les recommandations du fabricant. Les concentrations en ARN purifiés ont été estimées par mesure de l'absorbance (A) à 260 nm et leur qualité par le rapport A260nm/280nm et visuellement après
15 migration électrophorétique sur gel d'agarose.

Les ADN complémentaires des ARNm ont alors été synthétisés à l'aide d'un oligo-dT₁₈ comme amorce par réaction de rétrotranscription avec l'enzyme M-MLV (Réf. M1701, Promega, USA) en suivant les recommandations du fabricant.

La synthèse du second brin d'ADN a été réalisée par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) selon le protocole suivant : à 4 µl de la réaction de rétrotranscription sont ajoutés dans un volume final de 50 µl ; le tampon de réaction (1X final), 200 µM de chaque dNTPs, 300 nM d'amorces sens et antisens, 1,25 U de GoTaq polymérase (Ref M3175, Promega, USA).
20

Pour l'amplification de la partie variable des chaînes légères, 9 couples d'amorces différents ont été utilisés (MKRev2 à 8 + MKC5For) et 3 couples différents pour celles des chaînes lourdes (CA5 : VHRev1 + VHFor, CH10 : VHRev1 + MµCFor, CF12 : VHRev1 ou VHRev2 + MµCFor).
25

Tableau 10 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour séquencer les chaînes lourdes (VH) et légères (VL) de l'anticorps CA5.

Anticorps CA5		
Chaîne lourde (VH)		
Nom	Séquence 5'-3'	SEQ ID NO
VHRev1	CGGGATCCTCTAGAGGTCCAAGTGCAGGAGTCA GG	SEQ ID NO : 34
VHFor	CAGGGGCCAGTGGATAGAC	SEQ ID NO : 35

Chaîne légère (VL)		
MKRev5	GACATTGTGATGACCCAGTCT	SEQ ID NO : 36
MKC5For	GGATACAGTTGGTGCAGCATC	SEQ ID NO : 37

Tableau 11 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour séquencer la partie 5' des chaînes lourdes (VH) et légères (VL) de l'anticorps CA5.

Anticorps CA5		
Chaîne lourde (VH)		
Nom	Séquence 5'-3'	SEQ ID NO
CA5VH_Fw	CACTTTTACATGGTATCCAGTG	SEQ ID NO : 38
CA5VH_Rev	GTTTCTACTTGCAGCAATCCACT	SEQ ID NO : 39
Chaîne légère (VL)		
CA5VL_Fw	GAWTCACAGRCCCAGGTYC	SEQ ID NO : 40
CA5VL_Rev	CCCAGTAAATCAGCAGTTTAGGA	SEQ ID NO : 41

Tableau 12 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour séquencer les chaînes lourdes (VH) et légères (VL) de l'anticorps CH10.

Anticorps CH10		
Chaîne lourde (VH)		
Nom	Séquence 5'-3'	SEQ ID NO
VHRev1	CGGGATCCTCTAGAGGTCCAAGTGCAGGAGTCA GG	SEQ ID NO : 34
MμCFor	GGGGAAGACATTTGGGAAGG	SEQ ID NO : 42
Chaîne légère (VL)		
MKRev2	GATATTGTGATGACGCAGGCT	SEQ ID NO : 43
MKRev3	GATATTGTGATAACCCAG	SEQ ID NO : 44
MKRev4	GACATTGTGCTGACCCAATCT	SEQ ID NO : 45
MKRev6	GATATTGTGCTAACTCAGTCT	SEQ ID NO : 46
MKRev8	GACATCCAGCTGACTCAGTCT	SEQ ID NO : 47
MKC5For	GGATACAGTTGGTGCAGCATC	SEQ ID NO : 48

5 Tableau 13 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour séquencer la partie 5' des chaînes lourdes (VH) et légères (VL) de l'anticorps CH10.

Anticorps CH10		
Chaîne lourde (VH)		
Nom	Séquence 5'-3'	SEQ ID NO
CH10VH_Fw	ATGGTGTGGGGCTGAAGTG	SEQ ID NO : 49

CH10VH_Rev	CAGTTCATGGCGTAGGTATTGA	SEQ ID NO : 50
Chaîne légère (VL)		
CH10VL_Fw	TTCTGGAYTTCAGCCTCCAG	SEQ ID NO : 51
CH10VL_Rev	GATTGGGAAGCATATTTGATGAG	SEQ ID NO : 52

Tableau 14 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour séquencer les chaînes lourdes (VH) et légères (VL) de l'anticorps CF12.

Anticorps CF12		
Chaîne lourde (VH)		
Nom	Séquence 5'-3'	SEQ ID NO
VHRev1	CGGGATCCTCTAGAGGTCCAAGTGCAGGAGTCA GG	SEQ ID NO : 34
VHRev2	AGATCTAGAAAGCTTAGGTCAAGCTGCAGCAGTC AGG	SEQ ID NO : 53
MμCFor	GGGGAAGACATTTGGGAAGG	SEQ ID NO : 42
Chaîne légère (VL)		
MKRev2	GATATTGTGATGACGCAGGCT	SEQ ID NO : 43
MKRev3	GATATTGTGATAACCCAG	SEQ ID NO : 44
MKRev4	GACATTGTGCTGACCCAATCT	SEQ ID NO : 45
MKRev5	GACATTGTGATGACCCAGTCT	SEQ ID NO : 36
MKRev8	GACATCCAGCTGACTCAGTCT	SEQ ID NO : 47
MKC5For	GGATACAGTTGGTGCAGCATC	SEQ ID NO : 48

Tableau 15 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour séquencer la partie 5' des chaînes lourdes (VH) et légères (VL) de l'anticorps CF12.

Anticorps CF12		
Chaîne lourde (VH)		
Nom	Séquence 5'-3'	SEQ ID NO
CF12VH_F	CAGKAACTGCAGGTGTCCWCT	SEQ ID NO : 54
CF12VH_Rev	CTGGAGGATGTGTCTACAGTCAG	SEQ ID NO : 55
Chaîne légère (VL)		
CF12VL_Fw	CTGCTATGGGTGCTGCTGCTC	SEQ ID NO : 56
CF12VL_Rev	AGATTGGATGCAGCATAGATGAG	SEQ ID NO : 57

5 Le programme de PCR utilisé est composé d'une dénaturation initiale de 2 min à 95°C suivie de 30 cycles de dénaturation 30 sec à 95°C, hybridation 30 sec à 47°C et amplification 1 min à 72°C et enfin d'une amplification finale de 5 min à

72°C. Les produits de PCR obtenus ont été dessalés avec le kit QIAquick®Gel extraction kit (Ref 28704, Qiagen GmbH, Allemagne) puis ligaturés avec le plasmide pGEMT easy vector (Ref A1360, Promega, USA) pour être transformés en bactéries. L'ADN plasmidique extrait de différents clones bactériens a été

5

envoyé pour analyse par séquençage (Macrogen Europe, Pays-Bas). Les séquences nucléotidiques 5' terminales des VH et VL des 3 anticorps ont par la suite été déterminées grâce à la conception d'amorces spécifiques ancrées dans les séquences leader des ADNc (amorce Fw). Ces amorces ont été conçues suite à l'identification d'homologie par alignement entre les séquences

10

VL et VH obtenues précédemment et la base de données du logiciel IMGT/V-QUEST (Brochet et al., Nucl. Acids Res., 36 : W503-508, 2008; Giudicelli et al., Cold Spring Harb Protoc., 2011(6) : 695-715, 2011) [3, 4] et à l'extraction des séquences leader d'intérêt de IMGT/GENE-DB (Giudicelli et al., Nucl. Acids Res., 33 : D256-261, 2005) [5]. Les amorces anti-sens (Rev) ont été conçues dans les

15

séquences VH et VL respectives précédemment déterminées de chacun des anticorps. Le protocole utilisé pour obtenir la partie 5'est le même que celui décrit au paragraphe précédent.

Les séquences nucléotidiques consensus ont été déduites de l'alignement des séquences en utilisant le logiciel MultAlin (Corpet, Nucl. Acids Res., 16(22) : 10881-10890, 1988) [6]. La transcription en séquences polypeptidiques et l'annotation des CDRs ont été réalisées à l'aide de logiciel IMGT/V-QUEST. Les résultats sont présentés dans les tableaux 16-21.

20

Tableau 16 : Séquences nucléotidiques et peptidiques des parties variables lourdes (VH) et légères(VL) de l'anticorps CA5.

Anticorps (CA5)	
Chaîne lourde (VH)	
Séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1	GAGGTGAAGCTGGTGGAAATCTGGAGGAGGCTTGGTACAGCCTGG GGTTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAACTTCTGGGTTACCTTCAG TGATTTCTACATGGAGTGGGTCCGCCAGCCTCCAGGGAAGAGAC TGGAGTGGATTGCTGCAAGTAGAAACAAAGCTAAGGATTATACAA CAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCCGGTTCATCGTCTCCAGAG ACACTTCCCAAAGCATCCTCTACCTTCAGATGAATGCCCTGAGAG CTGAGGACACTGCCATTTATTTCTGTGCAAGAGATGCAAGGTTTG CTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
Séquence	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGKRL

peptidique SEQ ID NO : 2	EWIAASRNKAKDYTTTEYSASVKGRFIVSRDTSQSILYLQMNALRAEDT AIYFCARDARFAYWGQGLTVSA
Chaîne légère (VL)	
Séquence nucléotidique SEQ ID NO : 3	GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGTT GGAGAGAAGATTACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTA TATAGTAGCAATCAAAGAAGTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAA CCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATTTACTGGGCATCCACTAGG GAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGGAC AGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGC AGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGCTATCCTCGGACGTTCCGGT GGAGGCACCAAGCTGGAATCAAA
Séquence peptidique SEQ ID NO : 4	DIVMSQSPSSLAVSVGEKITMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKP GQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVKAEDLAVYY CQQYYSYPRTFGGGTKLEIK

Tableau 17 : Séquences nucléotidiques et peptidiques des parties variables lourdes (VH) et légères(VL) des anticorps CH10.

Anticorps CH10	
Chaîne lourde (VH)	
Séquence nucléotidique SEQ ID NO : 5	GAGGTGCAGCTTGTGAGTCTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTAA AGGGTCATTGAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAA TACCTACGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTT TGGAATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAAAGTAATAATTATGCAAC ATATTATGCCGATTCAGTGAAAGACAGGTTACCATCTCCAGAGA TGATTCACAAAGCATGCTCTATCTGCAAATGAACAACTTGAAACT GAGGACACAGCCATGTATTACTGTGTGAGACAGGATTACTACGGT AGTAGCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTC TCCTCA
Séquence peptidique SEQ ID NO : 6	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGL EWWARIRSKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTE DTAMYCYVRQDYGGSSYFDYWGQGTTLTVSS
Chaîne légère (VL)	
Séquence nucléotidique SEQ ID NO : 7	GACATTGTGATGACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCA GGAGATAGAGTCTCTTTTCTGCAGGGCCAGCCAGAGTATTAGC GACTACTTACACTGGTATCAACAAAAATCACATGAGTCTCCAAGG CTTCTCATCAAATATGCTTCCAATCCATCTCTGGGATCCCCTCCA

	GGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGTCAGATTTCACTCTCAGTATCA ACAGTGTGGAACCTGAAGATGTTGGAGTGTATTACTGTCAAATG GTCACAGCTTTCCGTACACGTTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAA ATAAAA
Séquence peptidique SEQ ID NO : 8	DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSIDYLHWYQQKSHESPRLL IKYASQSIGIPSRFSGSGSGSDFTLINSVEPEDVGVYYCQNGHSFP YTFGGGTKLEIK

Tableau 18 : Séquences nucléotidiques et peptidiques des parties variables lourdes (VH) et légères (VL) de l'anticorps CF12.

Anticorps CF12	
Chaîne lourde (VH)	
Séquence nucléotidique SEQ ID NO : 9	CAGGGTCAGATGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTGAAGCCTGG GGCTTCAGTGAAGCTGTCTGCAAGACTTCTGGCTTCACCTCAG CAGTAGCTATATAAGTTGGTTGAAGCAAAGCCTGGACAGAGTCT TGAGTGGATTGCATGGATTTATGCTGGAAGTGGTGGTACTAGCTA TAATCAGAAGTTCACAGGCAAGGCCCAACTGACTGTAGACACATC CTCCAGCACAGCCTACATGCAATTCAGCAGCCTGACAACTGAGGA CTCTGCCATCTATTACTGTGCAAGACACGGGTCCTACTTTGACTA CTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
Séquence peptidique SEQ ID NO : 10	QQMQQSGAELVKPGASVKLSCKTSGFTFSSSYISWLKQKPGQSLE WIAWIYAGTGGTSYNQKFTGKAQLTVDTSSTAYMQFSSLTTEDSAI YYCARHGSYFDYWGGTTLTVSS
Chaîne légère (VL)	
Séquence nucléotidique SEQ ID NO : 11	GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTA GGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTGGA TTATGATGGTGATAGTTATATGAACTGGTACCAACAGAAACCAGG ACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCT GGGATCCCAGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT CACCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCT ATTACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCGTACACGTTCCGGAGGGG GGACCAAGCTGGAAATAAAA
Séquence peptidique SEQ ID NO : 12	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGD SYMNWYQQKPGQ PPKLLIYAASNLESGIPARFSGSGSDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQ SNEDPYTFGGGTKLEIK

Tableau 19 : CDR des parties variables lourdes (VH) et légères(VL) de l'anticorps CA5

VH-CDR1 (SEQ ID NO: 13)	GFTFSDFY
VH-CDR2 (SEQ ID NO: 14)	SRNKAKDYTT
VH-CDR3 (SEQ ID NO: 15)	ARDARFAY
VL-CDR1 (SEQ ID NO: 16)	QSLLYSSNQKNY
VL-CDR2	WAS
VL-CDR3 (SEQ ID NO: 17)	QQYYSPRT

Tableau 20 : CDR des parties variables lourdes (VH) et légères(VL) de l'anticorps CH10

VH-CDR1 (SEQ ID NO: 18)	GFTFNTYA
VH-CDR2 (SEQ ID NO: 19)	IRSKSNNYAT
VH-CDR3 (SEQ ID NO: 20)	VRQDYYGSSYFDY
VL-CDR1 (SEQ ID NO: 21)	QSIDY
VL-CDR2	YAS
VL-CDR3 (SEQ ID NO: 22)	QNGHSFPYT

5 Tableau 21 : CDR des parties variables lourdes (VH) et légères(VL) de l'anticorps

CF12

VH-CDR1 (SEQ ID NO: 23)	GFTFSSSY
VH-CDR2 (SEQ ID NO: 24)	IYAGTGGT
VH-CDR3 (SEQ ID NO: 25)	ARHGSYFDY
VL-CDR1 (SEQ ID NO: 26)	QSVDYDGDSY
VL-CDR2	AAS
VL-CDR3 (SEQ ID NO: 27)	QQSNEDPYT

4/ Construction, production et caractérisation des scFv

10 a/ Construction des fragments d'anticorps scFv

Les gènes de synthèse des fragments variables simple chaîne (scFv) dérivés des anticorps CA5, CH10 et CF12 ont été synthétisés par ATG:Biosynthetics GmbH (Allemagne).

15 Chaque séquence a été conçue de la fusion des parties variables lourdes et légères (SEQ ID NO : 67/ SEQ ID NO: 69 pour CA5; SEQ ID NO: 71/ SEQ ID NO : 73 pour CH10 et SEQ ID NO: 75/ SEQ ID NO: 77 pour CF12) liées par une séquence codant pour le peptide (Gly₄Ser)₃ assurant la fonctionnalité de la

	<p>GCGCCGGTGGTGGCGGTTTCAGGTGGTGGCGGTAGCGGTGGCG GTGGCTCAGATATTCAGATGACCCAGACCCCGTCAAGCCTGGC GGTGTCAAGTCGGCGAAGAGATTACTATGAGCTGTAAAAGCTCGC AGAGCCTGCTGTACTCATCGAACCAGAAAAATTACCTGGCATGG TATCAACAGAAGCCGGGTCAGTCGCCGAAACTGCTGATCTACTG GGCCTCAACCCGTGAGAGCGGCGTACCGGATCGCTTTACTGGC AGCGGCAGCGGCACGGACTTTACGCTGACGATTAGCTCGGTGA AGGCCGAAGACCTGGCGGTTTATTATTGCCAACAGTACTATAGC TACCCTCGTACCTTCGGCGGCGGCACGAAACTCGAGATTAACA TCACCATCACCATCACTAACTCGAGATCAAGTAA</p>
<p>Séquence peptidique SEQ ID NO : 29</p>	<p>QVQLQQSGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWRQPPGKR LEWIAASRNKAKDYTTEYSASVKGRFIVSRDTSQSILYLQMNALRAE DTAIYFCARDARFAYWGQGLTVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQTPSSLAVSVGEEITMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQ SPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTISSVKAEDLAVYYC QQYYSYPRTFGGGTKLEIKHHHHH</p>

Tableau 23 : Séquences nucléotidique et peptidique du scFv CH10.

scFv CH10	
<p>Séquence nucléotidique SEQ ID NO : 30</p>	<p>CAGGTGCAGCTGCAGCAATCAGGCGGCGGCCTGGTCCAACCG AAAGGTAGCCTGAAACTGTCGTGCGCCGCCAGCGGCTTTACGT TCAACACTTACCGATGAATTGGGTGCGTCAGGCGCCTGGTAAA GGCCTGGAATGGGTGGCACGCATCCGTTCAAAAAGCAACAATTA CGCGACGTATTATGCAGACAGCGTAAAAGATCGCTTTACCATCA GCCGTGATGATTCACAGTCAATGCTGTACCTGCAAATGAATAAC CTGAAAAGTGAAGACACTGCGATGTATTATTGTGTTCCGCCAGGA CTATTACGGTAGCTCGTATTTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCA CCCTGACGGTGAGCTCGGGTGGCGGTGGCTCAGGTGGTGGTG GTAGCGGCGGTGGCGGTAGCGATATCCAGATGACCCAGACCCC GGCAACCCTGAGCGTTACCCCTGGTGACCGCGTTTCGCTGAGC TGCCGTGCCTCGCAGAGCATTTCGGACTATCTGCACTGGTATCA GCAAAAATCACACGAATCACCGCGTCTGCTGATTAAGTACGCCA GCCAATCGATTAGCGGTATTCCGAGCCGCTTTTCGGGCTCGGG TTCGGGCTCGGATTTTACCCTGTCAATTAATAGCGTAGAGCCGG AAGATGTAGGCGTCTACTATTGTCAGAACGGCCATTATTCCCG TACACGTTTGGCGGCGGCACCAAGCTCGAGATTAAGCATCACC</p>

	ATCATCACCATTAACCTCGAGATCAAGTAA
Séquence peptidique SEQ ID NO : 31	QVQLQQSGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNTYAMNWRQAPGKG LEWWARIRSKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKT EDTAMYYCVRQDYYGSSYFDYWQGTTTLTVSSGGGGSGGGGSG GGGSDIQMTQTPATLSVTPGDRVSLSCRASQSISDYLHWYQQKSH ESPRLLIKYASQSIGIPSRFSGSGSGSDFTLINSVEPEDVGVYYC QNGHSFPYTFGGGKLEIKHHHHH

Tableau 24 : Séquences nucléotidique et peptidique du scFv CF12.

scFv CF12	
Séquence nucléotidique SEQ ID NO : 32	CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCGGGTGGCGCAGAGCTGGTAAA CCGGGTGCGAGCGTTAAACTGAGCTGCAAACTAGCGGCTTTA CCTTTAGCTCGTCATATATTTTCGTGGCTGAAGCAGAAACCGGGC CAGTCACTGGAATGGATTGCGTGGATCTACGCAGGCACGGGTG GCACCTCATATAATCAGAAATTCACCGGTAAAGCGCAACTGACG GTCGATACCAGCAGCAGCACGGCGTACATGCAGTTCAGCTCGC TGACCACTGAAGATAGCGCAATCTACTATTGTGCACGCCATGGT TCGTACTIONGACTATTGGGGCCAGGGCACCACCCTGACCGTTTC AAGCGGTGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTGGTTCAGGTGGCGG CGGCTCAGATATTCAGATGACCCAGACCCCTGCGAGCCTGGCA GTGTCACTGGGCCAACGCGCAACCATCTCGTGTAAGCCTCGC AGAGCGTGGATTATGACGGCGATAGCTACATGAACTGGTATCAG CAAAGCCTGGTCAACCGCCGAAGCTGCTGATTTACGCCGCCA GCAACCTGGAATCGGGCATCCCGGCCCGTTTTAGCGGCTCAGG CTCGGGTACTGACTTCACGCTGAACATTCACCCGGTAGAAGAAG AAGACGCGGCCACGTACTACTGCCAGCAAAGCAATGAAGACCC GTACACTTTTGGCGGCGGCACGAACTCGAGATCAAACACCATC ACCATCACCATTAACCTCGAGATCAAGTAA
Séquence peptidique SEQ ID NO : 33	QVQLQQSGGAELVKPGASVKLSCKTSGFTFSSSYISWLKQKPGQS LEWIAWIYAGTGGTSYNQKFTGKAQLTVDTSSSTAYMQFSSLTTED SAIYYCARHGSYFDYWQGTTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGQP PKLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQ SNEDPYTFGGGKLEIKHHHHH

b/ Production des fragments d'anticorps recombinants

- Culture bactérienne

Une pré-culture a été réalisée dans 5 ml de milieu 2xYT contenant 50 µg/ml d'ampicilline toute la nuit à 37°C. Le lendemain, 500 µl de cette préculture a été
5 ensemencée dans 500 ml du même milieu et mis à croître à 37°C à 150 RPM jusqu'à obtenir une DO_{600nm} de 1,4. La synthèse du scFv a été induite par l'ajout de 0,1 mM d'IPTG 16 h à 16°C à 150 RPM.

- Extraction

10 Le milieu de culture a été centrifugé 30 min à 4500 g à 4°C. La suite de la préparation a été réalisée à 4°C. Pour extraire le périplasma bactérien, le culot a été remis en suspension et incubé dans 10 ml de TES (Tris 0,2 M pH8, EDTA 0,5M, saccharose 0,5 M) pendant 30 min auxquels ont alors été ajoutés 15 ml de TES dilué au ¼ pour être de nouveau incubé 30 min. L'extrait bactérien a été
15 centrifugé 30 min à 10 000g. Le surnageant a été mis à dialyser contre du PBS pendant une nuit. Le surnageant dialysé a été traité immédiatement pour purifier le scFv ou conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

La production du scFv dans le périplasma a été analysée par Western blot en utilisant un anticorps anti – His-Tag HRP (Ref R93125 Life technologies,
20 France) selon les conseils d'utilisation du fabricant.

- Purification

Le périplasma a été centrifugé pendant 20 min à 5 000 g à 4°C. Le surnageant a été incubé avec HIS-Select® Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich, MO, USA) sous agitation pendant 1h à 4°C. Le gel a été lavé avec un tampon phosphate de sodium 0,05 M, NaCl 0,3 M pH8 puis le même tampon additionné de 20 mM d'imidazole jusqu'à obtenir une DO_{280nm} proche de 0. Le scFv a alors été élué avec un tampon phosphate de sodium 0,05 M, NaCl 0,3 M, 250 mM imidazole pH8. L'éluat a été dialysé contre du PBS toute la nuit. Il est conservé à
30 -20°C.

- Contrôle qualité

Le scFv purifié a été analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 15% après coloration au bleu de Coomassie et par chromatographie d'exclusion

sur colonne Sephadex™ 75 10/300 GL (Ref 17-5174-01 GE Healthcare, Allemagne).

5/ Spécificité

5

La spécificité des anticorps et de leur scFv a été étudiée par technique ELISA. Chaque hormone évaluée a été préparée à la concentration de 10 µg/ml dans du tampon carbonate de sodium 0,1M pH 9,6 et distribuée à raison de 100 µl par puits sur une plaque ELISA. Le temps d'adsorption a été de 18 heures à +4°C. Après cinq lavages, les puits ont été traités avec 100 µl de PBS additionné de Tween 0,1% et de BSA 1% pendant 45 min à 37°C, puis chaque anticorps ou scFv a été distribué à raison de 100 µl/puits et incubé 1 heure à 37°C. Sur chaque hormone évaluée, les anticorps et les scFv ont été distribués à différentes concentrations selon une gamme de 10 à 250 µg/ml pour les anticorps et de 10 à 150 ou 200 µg/ml pour les scFv.

15

Après cinq lavages, un anticorps secondaire couplé à la peroxydase (HRP) a été distribué à raison de 100 µl/puits et incubé 1 heure à 37°C. Selon l'isotype de l'anticorps monoclonal étudié, l'anticorps secondaire a été un anti-IgG1 HRP (Réf. 115-035-205, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc), un anti-IgG2a HRP (Réf. 115-035-206, Jackson Laboratories) ou un anti-IgM HRP (Réf. 115-035-075, Jackson Laboratories). Pour les scFv, un anti-His Tag HRP (Réf. R93125 Life technologies, France) a été utilisé. Après cinq lavages, l'activité enzymatique a été révélée avec du TMB distribué à raison de 100 µl/puits. Le temps de révélation a été de 5 à 30 min à température ambiante selon la vitesse de la réaction. Après arrêt de la réaction avec H₂SO₄ 1M (50 µl/puits) l'intensité de la réaction colorée (Densité Optique) a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre pour plaques ELISA.

25

Pour les anticorps CA5 et CH10 et leur scFv, le pourcentage de réaction croisée a été calculé par rapport aux valeurs obtenues avec la FSH ovine (oFSH) considérée comme la valeur 100% de référence. Le pourcentage de réaction croisée a été calculé de façon classique en comparant les courbes dose-réponse obtenues avec la gamme de concentration de l'anticorps ou du scFv. A partir de la courbe obtenue avec l'hormone référence :

30

- soit A la concentration donnant 50% de la densité optique maximale (ED 50). A partir de la courbe obtenue avec une autre hormone,

35

- soit B la concentration correspondante à la même valeur de densité optique que celle utilisée pour définir A .

Le pourcentage de réaction croisée est égal à A divisé par B et multiplié par 100 : $[(A/B) \times 100]$.

5

- *Spécificité de l'anticorps CA5 et de son scFv*

Le tableau 25 illustre les pourcentages de réactions croisées de l'anticorps CA5 avec les sous-unités (s.u.) α et β de la FSH ovine et la sous-unité β de la FSH humaine :

10

Tableau 25

CA5	oFSH	s.u. α oFSH	s.u. β oFSH	s.u. β hFSH
Réaction croisée	100%	6%	80%	50%

L'anticorps CA5 reconnaît très peu la sous-unité α ovine mais fortement la sous-unité β de la FSH ovine (80%) ; il croise également avec la sous-unité β de la FSH humaine, moins fortement (50%). Sa spécificité est anti-sous unité β FSH.

Le tableau 26 illustre les pourcentages de réactions croisées de CA5 et du scFv CA5 avec la FSH porcine (pFSH) et différentes FSH humaines :

15

Tableau 26

	oFSH	pFSH	hFSH (Gonal F)	hFSH (Puregon)	hFSH (Fostimon)	hMG (Menopur)
CA5	100%	134%	128%	70%	76%	61%
scFv CA5	100%	61%	ND	ND	10%	10%

L'anticorps CA5 présente une forte reconnaissance de la FSH porcine et de la FSH humaine Gonal-F. Il croise également de façon significative avec les autres FSH humaines entre 61 et 76%. L'anticorps CA5 reconnaît mieux les FSH testées sous leur forme dimérique ce qui tend à indiquer une spécificité contre un épitope conformationnel.

20

Le scFv CA5 reconnaît de façon significative la pFSH (61%) et plus faiblement une hFSH (Fostimon) et la hMG (Menopur). La réaction croisée sur les deux autres FSH humaines n'a pu être mesurée (ND) en raison d'une liaison trop faible. La liaison du scFv CA5, tout comme celle de l'anticorps entier, semble donc être dépendante de la conformation de l'hormone, probablement altérée lors de l'adsorption sur le plastique de la plaque ELISA.

25

La spécificité du scFv CA5 a été évaluée vis-à-vis des LH porcine (pLH), ovine (oLH), bovine (bLH), de la eCG et des hCG Chorulon et Endo 5000. Les résultats sont illustrés dans le tableau 27 :

Tableau 27

	oLH	pLH	bLH	eCG	Chorulon	Endo 5000
scFv CA5	25%	29%	33%	ND	10%	ND

5 La liaison du scFv CA5 est significative vis-à-vis des LH animales avec une réaction croisée entre 35 et 40%. A l'inverse, seule la hCG Chorulon est faiblement reconnue (10%). La trop faible liaison sur les deux autres hCG adsorbées n'a pas permis de quantifier une réaction croisée. Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une spécificité envers un épitope conformationnel étant
10 donné les effets biologiques de CA5 et de son scFv obtenus *in vitro* et *in vivo* sur l'activité des hCG (voir résultats dans Exemple 2 et 3).

Cette hypothèse est renforcée par les résultats obtenus par western blot en incubant l'anticorps CA5 sur de la oFSH migrée sur gel de polyacrilamide 5% en conditions dénaturantes ou non-dénaturantes. Seule la bande de β oFSH a été
15 reconnue en conditions non-dénaturantes et a donné un signal important. Aucun signal n'a été observé sur la oFSH migrée en conditions dénaturantes.

Une estimation de la constante de dissociation K_d du scFv, vis-à-vis des différentes FSH, LH et CG étudiées, a été calculée sur GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA, version 5) en utilisant la fonction
20 "*One site - Specific binding*" dans un modèle de liaison à saturation ("*saturation binding experiment model*", GraphPad PRISM software). Les différentes valeurs obtenues sont indiquées dans les tableaux 28 et 29.

Tableau 28

scFv CA5	oFSH	pFSH	hFSH Gonal-F	hFSH Puregon	hFSH Fostimon	hMG Menopur
K_d ($10^{-6}M$)	0,54	1,24	1,43	2,67	2,03	2,41

Tableau 29

scFv CA5	oLH	pLH	bLH	eCG	hCG Chorulon	hCG Endo 5000
K_d ($10^{-6}M$)	1,95	2,47	2,43	4,07	3,80	3,14

25 La comparaison des constantes de dissociation K_d ainsi estimées indique une plus forte affinité du scFv CA5 pour les FSH ovine et porcine avec une valeur de 0,54 et 1,24 μM respectivement. A l'exception de la FSH humaine

recombinante Gonal F (Kd 1,43 μ M), le scFv CA5 présente une affinité moins élevée pour les FSH humaines (Kd de 2,03 à 2,67 μ M). Comparativement à oFSH et pFSH, le scFv CA5 présente une affinité moyenne vis-à-vis des LH ovine et porcine (Kd de 1,95 et 2,47 μ M respectivement). Les Kd estimés vis-à-vis des hCG et de la eCG (Kd de 3,14 à 4,07 μ M) indiquent une affinité plus faible du scFv CA5 pour ces hormones.

- *Spécificité de l'anticorps CH10 et de son scFv*

Le tableau 30 illustre les pourcentages de réactions croisées de l'anticorps CH10 avec les sous-unités (s.u.) α et β de la FSH ovine et la sous-unité β de la FSH humaine :

Tableau 30

CH10	oFSH	s.u. α oFSH	s.u. β oFSH	s.u. β hFSH
Réaction croisée	100%	43%	88%	40%

L'anticorps CH10 reconnaît préférentiellement la sous-unité β de la FSH ovine (88%) et deux fois moins la sous-unité β de la FSH humaine et la sous-unité α ovine (40% et 43%). Selon ces résultats, la spécificité de CH10 est anti-sous unité β FSH préférentiellement oFSH. Il reconnaît à un moindre degré, mais de façon non négligeable, la sous-unité α ovine à la différence de l'anticorps CA5. L'ensemble de ces résultats peuvent conduire à l'hypothèse d'un épitope impliquant principalement β mais également α , sur la zone d'association des deux sous-unités par exemple.

Le tableau 31 illustre les pourcentages de réactions croisées de CH10 et du scFv CH10 obtenus avec la FSH porcine (pFSH) et différentes FSH humaines :

Tableau 31

	oFSH	pFSH	hFSH (Gonal F)	hFSH (Puregon)	hFSH (Fostimon)	hMG (Menopur)
CH10	100%	24%	50%	71%	100%	48%
scFv CH10	100%	175%	32%	67%	30%	61%

L'anticorps CH10 et son scFv présentent une forte reconnaissance des FSH animales et une réaction croisée variant de 30 à 100% pour les FSH humaines.

La spécificité du scFv CH10 a été évaluée vis-à-vis des LH porcine (pLH), ovine (oLH), bovine (bLH), de la eCG et des hCG Chorulon et Endo 5000. Les résultats sont illustrés dans le tableau 32 :

Tableau 32

	oLH	pLH	bLH	eCG	Chorulon	Endo 5000
scFv CH10	68%	63%	52%	ND	ND	ND

La liaison du scFv CH10 vis-à-vis des LH animales est significative avec une réaction croisée entre 52 et 68%. A l'inverse, la trop faible liaison sur les hCG et la eCG adsorbées n'a pas permis de quantifier une réaction croisée. Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une spécificité envers un épitope conformationnel étant donné les effets biologiques de CH10 et de son scFv obtenus *in vitro* et *in vivo* sur l'activité des hCG Chorulon et Endo 5000 (voir résultats dans Exemple 2 et 3).

Une estimation de la constante de dissociation K_d du scFv CH10, vis-à-vis des différentes FSH, LH et CG étudiées, a été calculée sur GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA, version 5) en utilisant la fonction "One site - Specific binding" dans un modèle de liaison à saturation ("*saturation binding experiment model*", GraphPad PRISM software). Les valeurs obtenues sont indiquées dans les tableaux 33 et 34.

Tableau 33

scFv CH10	oFSH	pFSH	hFSH Gonal-F	hFSH Puregon	hFSH Fostimon	hMG Menopur
K_d ($10^{-6}M$)	2,85	5,22	1,82	11,5	1,59	7,36

Tableau 34

scFv CH10	oLH	pLH	bLH	eCG	hCG Chorulon	hCG Endo 5000
K_d ($10^{-6}M$)	1,55	2,47	1,94	1,97	1,47	2,09

Les constantes de dissociation K_d ainsi estimées indiquent une affinité du scFv CH10 tant pour les FSH ovine et porcine (K_d de 7,51 et 5,22 μM) que pour les FSH humaines Gonal F, Fostimon et l'hMG Menopur (K_d de 1,82, 1,59 et 7,36 μM respectivement). Les K_d estimées vis-à-vis des hCG et de la eCG (K_d de 1,47 à 2,09 μM) indiquent une bonne affinité du scFv CH10 pour ces hormones comparativement aux FSH.

- Spécificité du scFv CF12

Le scFv CF12 a permis d'obtenir une liaison quantifiable par une méthode ELISA, basée sur la révélation de la liaison de l'anticorps préparé à des concentrations croissantes sur différentes hormones adsorbées (liaison jusqu'à

saturation, Bmax). Les résultats sont exprimés en unités de densité optique obtenues après révélation.

Le tableau 35 représente les valeurs de densité optique obtenues avec le scFv CF12 incubé à la concentration de 200 µg/ml sur la FSH porcine (pFSH), ovine (oFSH) et sur différentes FSH humaines.

Tableau 35

	oFSH	pFSH	hFSH (Gonal F)	hFSH (Puregon)	hFSH (Fostimon)	hMG (Menopur)
scFv CF12	2,3	2,5	0,5	0,9	0,5	0,8

Le scFv CF12 présente une forte liaison sur la pFSH et la oFSH adsorbées, et une liaison plus faible sur les hFSH et la hMG (Menopur).

Le tableau 36 représente les valeurs de densité optique obtenues avec le scFv CF12 incubé à la concentration de 200 µg/ml sur la LH porcine (pLH), ovine (oLH), bovine (bLH), la eCG et les hCG Chorulon et Endo 5000.

Tableau 36

	oLH	pLH	bLH	eCG	Chorulon	Endo 5000
scFv CF12	2	2,2	2,2	0,6	0,35	0,38

La liaison du scFv CF12 sur les LH animales est importante, à l'inverse des hCG et de la eCG adsorbées pour lesquelles la liaison est plus faible.

La liaison de CF12 et celle du scFv CF12 semblent donc extrêmement contraintes par la conformation de l'épitope particulièrement pour les hormones humaines. Etant donné les effets biologiques remarquables obtenus avec CF12 et son scFv, *in vitro* et *in vivo* sur l'activité des FSH humaines et des hCG Chorulon et Endo 5000 (voir résultats dans Exemple 2 et 3), il est probable que la liaison du scFv CF12 tout comme celle de l'anticorps entier soit totalement dépendante de la conformation de l'hormone. L'hypothèse d'une altération de la liaison de CF12 et du scFv CF12 due à une modification de la conformation des hormones adsorbées sur le plastique de la plaque ELISA peut expliquer ces résultats et renforce l'hypothèse que CF12 et son scFv sont spécifiques d'un épitope extrêmement conformationnel.

Une estimation de la constante de dissociation Kd du scFv, vis-à-vis des différentes FSH, LH et CG étudiées, a été calculée sur GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA, version 5) en utilisant la fonction "One site - Specific binding" dans un modèle de liaison à saturation ("*saturation*

binding experiment model", GraphPad PRISM software). Les différentes valeurs obtenues sont indiquées dans les tableaux 37 et 38.

Tableau 37

	oFSH	pFSH	hFSH Gonal-F	hFSH Puregon	hFSH Fostimon	hMG Menopur
Kd (10^{-6} M)	3,779	2,628	4,874	25,22	2,634	14,01

Tableau 38

	oLH	pLH	bLH	eCG	hCG Chorulon	hCG Endo 5000
Kd (10^{-6} M)	5,813	4,729	5,033	6,116	5,074	6,238

5 La comparaison des constantes de dissociation Kd ainsi estimées indique une plus forte affinité du scFv pour les FSH ovine, porcine et humaines (Gonal-F et Fostimon) avec une valeur de Kd allant de 2,6 μ M pour pFSH et hFSH Fostimon à 3,77 μ M pour oFSH et 4,87 μ M pour hFSH Gonal-F.

10 Les valeurs de Kd pour les LH animales, eCG et les hCG Chorulon et Endo 5000 sont relativement homogènes et varient entre 4,72 à 6,23 μ M, témoignant d'une affinité un peu plus faible du scFv CF12 pour ces hormones comparativement aux FSH ci-dessus.

15 Vis-à-vis de la hFSH Puregon et de la hMG Menopur, le scFv CF12 présente une affinité encore plus faible avec un Kd de l'ordre de la dizaine de μ M : 14 et 25,22 μ M respectivement.

EXEMPLE 2 : MESURE IN VITRO DE L'EFFET POTENTIALISANT DES LIGANDS DE L'INVENTION SUR LA BIOACTIVITE DE LA FSH

20 La mise en évidence de l'effet potentialisant des ligands de l'invention sur la bioactivité de la FSH a été réalisée en comparant la réponse biologique obtenue avec différents types ou lignées cellulaires stimulées soit avec la FSH seule soit avec le complexe FSH / anticorps monoclonal (AcM).

25 Dans chacun des cas, la comparaison des courbes dose-réponse obtenues a permis de quantifier l'effet potentialisant *in vitro* de l'AcM sur l'activité biologique de la FSH complexée. L'analyse statistique des résultats a été faite par le logiciel Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA, version 5).

1/ Sur cultures primaires de cellules de granulosa bovines

L'effet potentialisant des AcM CA5, CH10 sur la bioactivité de la FSH ovine (oFSH) et de l'AcM CF12 sur la FSH humaine (hFSH) a tout d'abord été caractérisé sur des cellules de granulosa bovines exprimant de façon endogène le récepteur FSH bovin.

Des surnageants d'hybridomes à la concentration finale de 0,1µg/ml d'anticorps CA5, CH10 ou CF12 ont été incubés avec une gamme de FSH ovine ou humaine allant de 3 ng/ml à 25 ng/ml, 30 mn à 37°C.

Les cellules de granulosa bovines ont été ponctionnées sur des ovaires de vache à partir de follicules de diamètre allant de 2 à 6 mm, selon le protocole décrit par Chopineau et al. (Mol. Cell Endocrinol., 92(2) : 229-39, 1993) [8] et Wehbi et al. (Endocrinology, 151(6) : 2788–2799, 2010) [9]. Les cellules de granulosa bovines en suspension dans un milieu McCoy's 5A (Lonza, Belgique, référence BE12-688F), préparées à raison de 80 000 cellules par 0,5 ml, ont été stimulées pendant 3 heures à 37°C, sous agitation, en présence d'IBMX 48 µg/ml (Sigma Aldrich, France, référence I5879), par une gamme de FSH allant de 3 ng/ml à 25 ng/ml, seule ou préalablement complexée à un anticorps monoclonal selon le protocole ci-dessus. La réponse biologique mesurée a été la sécrétion en AMPc.

Après centrifugation, l'AMPc produit a été dosé dans le surnageant de culture à l'aide d'un kit ELISA (Biomedical Technologies Inc., MA, USA, BT-730).

Les résultats sont présentés dans la figure 1.

Les résultats montrent une amplification de la sécrétion d'AMPc d'un facteur 1,3 fois pour CA5, d'un facteur 5,5 fois pour CH10 sur l'activité de la FSH ovine. On enregistre une amplification de 2,5 fois pour CF12 sur l'activité de la FSH humaine. L'analyse statistique par analyse de variance à deux variables (*two-way* ANOVA, GraphPad PRISM software) montre un effet significatif allant de $p < 0,05$ (*) pour CA5 à $p < 0,01$ (**) et $p < 0,001$ (***) pour CH10 et CF12. Seul l'anticorps CF12 a un effet significatif pour l'ensemble des concentrations de hFSH testées.

2/ Sur lignée cellulaire HEK293 transfectées de façon stable avec le récepteur FSH humain

L'effet potentialisant des AcM sur la FSH de différentes espèces a été mesuré sur des cellules HEK 293 exprimant de manière stable le récepteur FSH

humain. Ce système a permis de mesurer la production d'AMPc suite à l'activation du récepteur de la FSH après une stimulation par la FSH seule ou par le complexe FSH / ACM pendant 1 heure à 37°C.

Pour cela, 60 000 cellules ont été réparties dans des puits de plaques 96 puits (Becton Dickinson, NJ, USA, référence 353072) et cultivées 24h à 37°C, 5% CO₂ en atmosphère humide, dans 100 µl de milieu MEM (Ozyme, France, référence BE12-611F) contenant du SVF 10% (Lonza, Belgique, référence DE14-801F), pénicilline/streptomycine 1% (Sigma Aldrich, France, référence P-4333) et G418 400 µg/ml (Sigma Aldrich, France, référence A1720). Après 2h de sevrage dans du milieu MEM, les cellules ont été stimulées pendant 1h à 37°C. Le surnageant de culture a été récupéré et dosé à l'aide d'un kit ELISA (Biomedical Technologies Inc., MA, USA, BT-730). Les résultats expriment la quantité d'AMPc sécrétée en point final. Ils ont été analysés grâce au logiciel Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA, version 5).

La figure 2 représente l'effet potentialisant des anticorps monoclonaux CA5 et CH10 sur la bioactivité de la FSH ovine (oFSH) et l'effet de l'anticorps monoclonal CF12 sur la bioactivité de la FSH humaine *in vitro* sur des cellules HEK 293 transfectées de façon stable avec le récepteur FSH humain. Pour cela, les cellules ont été stimulées soit avec une gamme allant de 3 ng/ml à 32,5 ng/ml pour la FSH ovine et de 0,3 à 3 ng/ml pour la FSH humaine (Gonal-F, Laboratoire Serono), soit avec les mêmes points de gamme FSH préalablement incubés, 30 minutes à 37°C, avec l'anticorps monoclonal (concentration finale 0,1 µg/ml) avant la stimulation des cellules. Une analyse de variance à deux variables (*two-way ANOVA*, GraphPad PRISM software) a permis de comparer les courbes dose-réponse obtenues avec la FSH seule ou avec le complexe FSH/anticorps monoclonal. L'anticorps CA5 a montré un effet potentialisant allant de 160% à 200% sur l'activité de la oFSH ; cet effet est significatif pour la concentration 32,5 ng/ml de oFSH ($p < 0,05$). L'anticorps CH10 exerce un effet potentialisant plus important sur la oFSH pour l'ensemble des concentrations testées allant de 225% pour le point 3 ng/ml ($p < 0,01$) à 260% pour les points 10 ng/ml et 33 ng/ml respectivement ($p < 0,001$). Quant à l'anticorps CF12, les résultats obtenus avec la FSH humaine recombinante (Gonal-F, laboratoire Serono) montrent un effet potentialisant de l'activité hormonale de 140% à 0.5ng/ml et 160% pour les concentrations 1 et 3 ng/ml respectivement. Cet effet est significatif pour le point 3 ng/ml de FSH humaine ($p < 0,01$). par un test-t apparié (test de Wilcoxon).

3/ Sur lignée cellulaire HEK293 transfectées de façon stable avec le récepteur FSH humain et avec le système Glosensor®

5 L'effet potentialisant des AcM sur les FSH de différentes espèces a été mesuré en temps réel sur des cellules HEK 293 exprimant de manière stable le récepteur FSH humain et le vecteur GloSensor™ (Promega, France). Ce système cellulaire a permis de suivre la production d'AMPc suite à la stimulation du récepteur FSH par l'agoniste (FSH seule ou complexe FSH / anticorps
10 monoclonal) en temps réel. Suite à la liaison de l'AMPc sur la protéine GloSensor™, le substrat GloSensor™ (Promega, France, référence E1291) a été hydrolysé et conduit à une émission de luminescence mesuré grâce à un lecteur PolarStar Optima (BMG Labtech, Allemagne) et exprimée en RLU (Relative Luminescence Unit). Cette lignée stable a été développée par l'équipe de Biologie
15 et BioInformatique des Systèmes de Signalisation au centre INRA Val de Loire, 37380 Nouzilly, France) et a été mise gracieusement à disposition pour ces essais.

Pour cela, les cellules HEK 293 ont été mises en culture à raison de 80 000 cellules par puits de microplaque 96 puits blanc à fond transparent (Dominique
20 Dutscher, France, référence 655903) et cultivées dans 100 µl de milieu MEM (Ozyme, France, référence BE12-611F) supplémenté de SVF 10% (Lonza, Belgique, référence DE14-801F), pénicilline / streptomycine 1% (Sigma Aldrich, France, référence P-4333), Hygromycine B 200 µg/ml (Life Technologies™, France, référence 10687010) et G418 400 µg/ml (Sigma Aldrich, France, référence A1720) pendant une nuit. Après 2h de sevrage dans 100 µl de milieu
25 MEM supplémenté de BSA 1% (PAA, France, référence K45012) et contenant 4% de substrat GloSensor™ pendant 2h à température ambiante à l'abri de la lumière, la plaque de cellules a été mise dans le lecteur PolarStar Optima et une première lecture a été faite pendant 5 minutes pour mesurer le niveau basal de
30 luminescence. La plaque a ensuite été retirée du lecteur et 11 µl de ligand (FSH seule ou complexe FSH / anticorps monoclonal) y ont été ajoutés de manière à obtenir les concentrations indiquées. La luminescence émise a ensuite été mesurée pendant environ 1h30.

Les résultats obtenus ont été analysés grâce au logiciel Prism (GraphPad
35 Prism Software Inc., San Diego, CA, USA, version 5). La fonction non linéaire

« log (agoniste) versus response » a été utilisée pour tracer la réponse en fonction de la concentration de FSH. Ceci a permis de caractériser et comparer l'EC50 pour la FSH seule et la FSH complexée à l'anticorps monoclonal. Pour chaque exemple, l'effet significatif du complexe FSH / anticorps potentialisant a été mesuré par analyse de variance à deux variables (*two-way* ANOVA, GraphPad PRISM software) en comparant les deux courbes dans leur totalité.

- *Anticorps monoclonal CA5*

La figure 3 illustre les courbes de cinétique de production d'AMPc exprimées en unités relatives de luminescence en fonction du temps (en minutes) obtenues aux concentrations 0 - 0,1 - 0,3 – 1 et 3 nM de FSH ovine seule ou complexée à l'anticorps CA5. On observe que les cellules « stimulées » par l'anticorps seul, sans FSH, ne montrent aucune réponse : le signal luminescent reste à son niveau basal (courbe 3A). L'anticorps CA5 seul n'exerce aucun effet agoniste ou antagoniste sur le récepteur FSH humain exprimé par les cellules HEK 293. A l'inverse, l'anticorps monoclonal CA5 (concentration finale 6 nM), complexé à la oFSH amplifie de façon très significative et remarquable l'activité stimulante de l'hormone. On observe ainsi une augmentation de la réponse maximale cellulaire de 350% et 330% aux concentrations de 0,1 et 0,3 nM de oFSH (courbes B et C) et une augmentation de 230% et 140% respectivement pour les concentrations de 1 et 3 nM de oFSH (courbes D et E). L'amplitude de l'effet potentialisant devient moins importante avec les plus fortes concentrations de oFSH (1 et 3 nM) en raison d'une saturation de la réponse cellulaire et du signal luminescent à 11000 RLU dans ce cas. La valeur des EC50 mesurée par GraphPad Prism est de $2,36 \cdot 10^{-9} \text{M}$ pour la oFSH et de $2,83 \cdot 10^{-10} \text{M}$ pour le complexe oFSH/CA5 traduisant une augmentation de 1 unité de LogEC50 (de $10^{-8,6}$ à $10^{-9,54}$) lorsque la FSH est complexée à l'anticorps CA5. La différence des deux courbes oFSH versus oFSH/CA5 est hautement significative pour l'ensemble des doses de oFSH testées ($p < 0,001$).

L'effet potentialisant de l'anticorps CA5 mesuré sur la FSH porcine est illustré par la figure 4. On observe une augmentation de 190% du maximum de la réponse à 0,03 nM de pFSH lorsque celle-ci est complexée à l'anticorps CA5 (concentration finale 6 nM) (courbe A), mais cette augmentation n'est pas significative. L'effet potentialisant atteint 250% à la concentration 0,1 nM de pFSH (courbe B) et est significatif ($p < 0,01$). Le niveau de réponse obtenu avec pFSH

0,03 nM complexée à CA5 est équivalent à celui obtenu avec pFSH 0,1 nM seule (500 RLU versus 585 RLU respectivement) ; ce qui signifie que le complexe pFSH 0,03 nM / CA5 induit la même amplitude de réponse que la pFSH seule à une concentration 3,3 fois plus élevée (0,1 nM ; soit 0,5 Log).

5 Enfin, l'effet potentialisant de CA5 a été étudié sur l'activité de la FSH humaine recombinante (Gonal-F, Laboratoire SERONO). La figure 5 illustre les courbes de cinétique de production d'AMPC exprimées en unités relatives de luminescence en fonction du temps (minutes) obtenues au cours d'une stimulation avec les concentrations 0,03 - 0,1 - 0,2 - 0,3 nM de FSH seule ou
10 complexée à l'anticorps CA5 (6 nM). Un effet potentialisant de 235% a été observé avec la concentration 0,03 nM hFSH, 200% avec 0,1 et 0,2 nM de hFSH puis 170% avec la plus forte concentration 0,3 nM hFSH en raison d'une saturation du système cellulaire (maximum 10530 RLU). Le calcul des EC50 par GraphPad Prism a indiqué une valeur de $5,86 \cdot 10^{-10}$ M pour la hFSH et de
15 $1,36 \cdot 10^{-10}$ M pour le complexe hFSH/CA5 traduisant une augmentation de 0,63 en LogEC50 (de $10^{-9,23}$ à $10^{-9,86}$) lorsque la FSH est complexée avec l'anticorps CA5. L'effet potentialisant du scFv CA5 a également été étudié sur la bioactivité de la hFSH à 0,01 nM. Une augmentation significative de 160% ($p < 0,01$) a été obtenue
20 à la concentration de 36 nM de scFv (Figure 5). Cette augmentation était semblable à celle de l'anticorps entier, bivalent CA5. Ce résultat signifie que le fragment monovalent possède les mêmes propriétés potentialisantes de l'activité FSH que l'anticorps CA5.

 Bien que significatif ($p < 0,01$), l'effet potentialisant de l'anticorps CA5 sur la bioactivité de la FSH humaine reste moins important que sur la bioactivité de la
25 FSH ovine pour laquelle une augmentation d'une unité de Log a été obtenue entre l'EC50 de la oFSH et celui du complexe oFSH / CA5.

- Anticorps monoclonal CH10

 L'effet modulateur de l'anticorps CH10 a été étudié sur la FSH ovine
30 (oFSH) et sur la FSH humaine (hFSH) (Gonal F, Laboratoire SERONO).

 La Figure 6 illustre l'effet amplificateur de l'anticorps CH10 (10nM) sur la bioactivité de la oFSH préparée aux concentrations 0,01 - 0,03 et 0,1 nM. Sur les faibles concentrations (0,01 et 0,03 nM) on obtient une augmentation de 185% de la réponse cellulaire avec le complexe oFSH / CH10 (courbes A et B). A la

concentration de 0,1 nM de oFSH, l'augmentation est de 312% avec le complexe oFSH / CH10 (courbe C). Ces augmentations sont très significatives ($p < 0,001$).

L'effet potentialisant de CH10 (1,3 nM) a été mesuré sur la FSH humaine préparée de 0,1 nM à 3 nM (Figure 7A et B). Une augmentation modérée mais
5 significative ($p < 0,001$) allant de 140% à 150% a été observée. Les EC50 mesurés par GraphPad Prism ont été de $2,85 \cdot 10^{-10}$ M pour la hFSH et de $3,17 \cdot 10^{-10}$ M pour le complexe hFSH / CH10 (Figure 7C).

L'effet potentialisant de CH10 s'exerce plus spécifiquement sur la FSH ovine, animale. Un faible effet de l'anticorps CH10 a été observé sur la FSH
10 humaine.

- Anticorps monoclonal CF12

L'effet potentialisant de l'anticorps monoclonal CF12 a été caractérisé sur la bioactivité de la FSH humaine, ovine et porcine.

La Figure 8 illustre l'effet potentialisant remarquable de CF12 sur la
15 bioactivité de la FSH humaine (Gonal-F, Laboratoire SERONO). Cet effet remarquable est parfaitement quantifiable aux concentrations faibles de 0,01 nM et 0,03 nM de hFSH pour lesquelles le système cellulaire n'est pas à saturation (courbes A et B). On observe ainsi une augmentation du signal de luminescence
20 de 280% et 341% respectivement, hautement significatives ($p < 0,001$). Pour les concentrations plus élevées (0,1 – 0,3 et 1 nM), l'augmentation de la réponse cellulaire est de 181%, 147% et 120% respectivement, en raison probablement d'une saturation progressive du signal luminescent jusqu'à 46000 RLU (courbes C, D et E). Pour les courbes C, D et E l'augmentation reste très significative
25 ($p < 0,001$). La valeur des EC50 mesurée par GraphPad Prism est de $4,25 \cdot 10^{-10}$ M pour la hFSH et de $9,38 \cdot 10^{-11}$ M pour le complexe hFSH / CF12 traduisant une augmentation de la bioactivité de l'hormone de 0,7 unité de LogEC50 (de $10^{-9,37}$ à $10^{-10,03}$ respectivement) lorsqu'elle est complexée à l'anticorps potentialisant CF12 (courbe F).

L'effet potentialisant du scFv CF12 (40 nM) a également été mesuré sur
30 l'activité de la FSH humaine (Gonal F, Laboratoire Serono) préparée à la concentration de 0,01 nM (Figure 9). L'effet de l'anticorps entier CF12 (6 nM) a été mesuré parallèlement pour comparaison. Les courbes obtenues avec le complexe hFSH / scFv CF12 ou hFSH / anticorps CF12 se superposent
35 parfaitement, indiquant un effet identique du fragment d'anticorps monovalent.

L'effet potentialisant exercé par CF12 est également très significatif sur la FSH ovine comme l'illustre la figure 10 où l'on observe une augmentation de la réponse cellulaire de 240%, 300% et 350% au cours d'une stimulation avec le complexe CF12 / oFSH pour les concentrations 0,01 nM – 0,03 nM et 0,1 nM d'hormone (courbes A, B, C). CF12 a été préparé à 10 nM. De même que pour la hFSH, pour les concentrations plus élevées 0,3 nM et 1nM (courbes D et E), l'augmentation de la réponse cellulaire est de 200% et 130% respectivement due à une saturation progressive du signal luminescent jusqu'à 40000 RLU. La valeur des EC50 mesurée par GraphPad Prism est de $2,29 \cdot 10^{-9} \text{M}$ pour la oFSH et de $1,96 \cdot 10^{-10} \text{M}$ pour le complexe oFSH / CF12 traduisant une augmentation de la bioactivité de l'hormone de 1,06 LogEC50 (de 8,64 à 9,7 respectivement) lorsqu'elle est complexée à l'anticorps potentialisant CF12 (courbe F). Les effets potentialisants observés sur la réponse cellulaire sont dans tous les cas hautement significatifs ($p < 0,001$).

Les courbes de la Figure 11 illustrent l'effet potentialisant de CF12 (10 nM) sur la FSH porcine préparée aux concentrations 0,01 – 0,03 – 0,1 – 0,3 et 1 nM. Cet effet est parfaitement quantifiable aux concentrations les plus faibles 0,01 nM - 0,03 nM et 0,1 nM de pFSH pour lesquelles le système cellulaire n'est pas à saturation (courbes A, B, C). On observe ainsi une augmentation très significative et importante du signal de luminescence de 220%, 350% et 330% respectivement. Pour les concentrations plus élevées (0,3 et 1 nM), l'augmentation de la réponse cellulaire est moindre, respectivement de 175% et 114%, due à une saturation progressive du signal luminescent jusqu'à la limite de 40000 RLU (courbes D et E). La valeur des EC50 mesurée par GraphPad Prism est de $1,92 \cdot 10^{-9} \text{M}$ pour la pFSH et de $3,69 \cdot 10^{-10} \text{M}$ pour le complexe pFSH / CF12 traduisant une augmentation de la bioactivité de l'hormone de 0,717 LogEC50 (de $10^{-8,715}$ à $10^{-9,432}$ respectivement) lorsqu'elle est complexée à l'anticorps potentialisant CF12 (courbe F).

30 **4/ Sur cultures primaires de cellules de granulosa humaines**

Les cellules de granulosa humaines ont été récupérées et cultivées comme décrit dans Reverchon et collaborateurs (Reverchon et al., Human Reprod., 27(6) : 1790-1800, 2012) [11].

Ces cellules ont été récupérées à partir de liquides folliculaires récoltés à l'issue de ponction ovocytaires chez des femmes traitées pour une Fécondation In Vitro (FIV) dans le cadre d'une procréation médicalement assistée (PMA). Ces cellules ont été isolées par centrifugation sur un gradient de Percoll 40%,
5 resuspendues dans un milieu McCoy's 5A complet (Lonza, Belgique, référence BE12-688F) puisensemencées dans des plaques 24 puits (Becton Dickinson, NJ, USA, référence 353047) à raison de 30 000 cellules par puits dans un volume final de 500 μ l et cultivées pendant 48 heures. Elles ont ensuite été stimulées soit avec de la FSH humaine seule soit avec le complexe FSH humaine / AcM
10 pendant 48 heures. Les FSH humaines utilisées ont été principalement la Gonal-F, hormone recombinante commercialisée par le laboratoire pharmaceutique SERONO, (SERONO, Europe, Limited) et la Fostimon, FSH extraite à partir d'urine de femmes ménopausées, commercialisée par le laboratoire pharmaceutique GENEVRIER (France). Après la stimulation, les surnageants ont
15 été récupérés et centrifugés. L'AMPc produit a été dosé dans chaque surnageant de culture à l'aide d'un kit ELISA (Biomedical Technologies Inc., MA, USA, BT-730).

Les cellules issues de 23 patientes ont été préparées séparément et mises en culture séparément selon la méthode décrite ci-dessus. Chaque culture
20 cellulaire issue d'une patiente a été divisée en deux lots : l'un a été stimulé par une gamme de FSH allant de 10^{-11} M à 10^{-8} M, l'autre a été stimulé par le complexe anticorps monoclonal CF12 / hFSH aux différentes concentrations de la gamme. L'anticorps a été préparé à la concentration finale de 0,1 nM ou à 4 nM. Pour chaque patiente, les courbes doses-réponses obtenues dans les deux conditions
25 ont été comparées afin d'évaluer l'effet potentialisant de l'anticorps sur la bioactivité de l'hormone humaine utilisée.

Les cultures cellulaires issues des 23 patientes ont montré des réponses à la stimulation par hFSH et/ou par le complexe hFSH / anticorps très différentes. Seules les cellules de 12 patientes sur les 23 totales ont répondu à une
30 stimulation par la FSH seule, quel que soit la hFSH utilisée, et à une stimulation par le complexe FSH / anticorps (Figure 12, courbes A, B, C). Ces résultats sont illustrés sur la figure 12. La courbe A représente la réponse cellulaire d'une patiente à une stimulation par la Gonal F et par la Fostimon ; les EC50 mesurés ont été de $7 \cdot 10^{-11}$ et $1 \cdot 10^{-9}$ respectivement. Les courbes B et C illustrent deux cas
35 représentatifs de patientes dont les cellules de granulosa ont répondu à la fois à

une stimulation par la hFSH seule (Gonal-F pour la courbe B et Fostimon pour la courbe C) et par le complexe CF12 / hFSH. Dans le cas de la courbe B, l'EC50 de la courbe dose-réponse obtenue avec le complexe est supérieur à celui obtenu avec l'hormone seule ($7,52 \cdot 10^{-10}$ M versus $2,42 \cdot 10^{-9}$ M). Dans le cas de la courbe C, les EC50 ne sont pas différents ($2,28 \cdot 10^{-9}$ M versus $3,61 \cdot 10^{-9}$ M).

Sur les 11 patientes restantes, les cellules issues de quatre d'entre elles n'ont répondu ni à une stimulation par la FSH ni à une stimulation par le complexe FSH / CF12. A l'inverse, et de façon étonnante, les cellules issues des 7 autres patientes ont répondu uniquement à une stimulation par le complexe FSH / anticorps potentialisant alors qu'aucune augmentation de la sécrétion d'AMPC n'a été observée après stimulation avec la hFSH seule dans la même gamme de concentrations. Ces résultats remarquables sont illustrés par la Figure 13, courbes A à F, chaque courbe représentant la réponse des cellules de granulosa d'une patiente différente. Dans chacun des cas, l'anticorps CF12 a été utilisé à 0,1 nM. Deux patientes ont donné une même courbe dose-réponse illustrée par la courbe D. Ces résultats démontrent très clairement que chez ces patientes, seul le complexe hFSH / anticorps CF12 est capable d'induire une stimulation fonctionnelle du récepteur hFSHR à l'inverse de la FSH seule qui n'entraîne aucune activation du récepteur hFSHR. Le taux de sécrétion maximale en AMPC obtenu sous stimulation par le complexe hFSH / anticorps CF12 se situe entre 6 et 15 pmol/ml équivalent au taux de sécrétion maximale obtenu avec des cultures cellulaires ayant normalement répondu à la hFSH (Figure 12). Les EC50 mesurés par GraphPad Prism pour chacune des courbes dose-réponse sont illustrés dans le Tableau 39 :

Tableau 39

patiente	A	B	C	D*	E	F
EC50 (M)	$2,15 \cdot 10^{-10}$	$1,11 \cdot 10^{-9}$	$4,27 \cdot 10^{-10}$	$1,71 \cdot 10^{-10}$	$8,91 \cdot 10^{-11}$	ND

* : l'EC50 obtenu pour la patiente G a été identique à celui de la patiente D.

Le complexe hFSH / anticorps CF12 se comporte donc comme un nouveau ligand, comme un nouvel agoniste capable d'activer le hFSHR chez des patientes naturellement réfractaires à une stimulation classique par hFSH recombinante ou extraite. L'utilisation d'un mélange hFSH / anticorps potentialisant peut ainsi apporter une nouvelle alternative dans les traitements hormonaux d'induction de l'ovulation (mono ou poly ovulation) chez des patientes ne répondant pas aux traitements hormonaux classiques utilisés en biologie de la reproduction humaine.

EXEMPLE 3 : MESURE IN VIVO DE L'EFFET POTENTIALISANT DES LIGANDS DE L'INVENTION SUR LA BIOACTIVITE DES FSH et LH/CG DANS LE MODELE RAT

5

Après avoir été caractérisé *in vitro*, l'effet potentialisant de chaque anticorps monoclonal a été caractérisé *in vivo*, chez le rat femelle pour leur effet sur la bioactivité de la FSH et chez le rat mâle pour leur effet sur la bioactivité de la LH/CG, qu'ils reconnaissent également.

10

Pour mesurer la bioactivité FSH, le protocole utilisé a été celui du dosage biologique décrit par Steelman et Pohley (Steelman SL, Pohley FM. *Endocrinology*, 53 :604-616. 1953) [12]. Pour mesurer la bioactivité LH, le protocole utilisé a été celui du dosage décrit par Scobey et collaborateurs (Scobey et al, *Reprod. Biol. Endocr.* 3 :61, 2005) [13].

15

L'effet des anticorps sur l'activité FSH a été évalué en utilisant des FSH ovine et humaines. L'effet des anticorps sur l'activité LH a été évalué sur deux préparations de hCG (human Chorionic Gonadotropin).

20

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA, version 5). Les résultats portant sur des expériences réalisées sur des lots de 5 animaux, une analyse de variance à une variable, non paramétrique (test de Kruskal Wallis), suivie d'une correction de Dunns, a été appliquée ou un test-t non-paramétrique (test de Mann-Whitney). Pour les résultats portant sur des effectifs plus importants (n>30) issus de la compilation de plusieurs bioassays, un test paramétrique (test t de Student non apparié) suivi d'une correction de Bonferroni a été appliqué.

25

1/ Effet potentialisant des anticorps sur la bioactivité de la FSH chez la Ratte

30

L'effet potentialisant des anticorps CA5, CH10 et CF12 et de leur scFv a été étudié sur la FSH ovine et sur différentes préparations de FSH humaine utilisées en reproduction humaine dans le cadre des traitements de procréation médicalement assistée : la Gonal-F et la Puregon (FSH recombinantes des laboratoires Merck Serono et Merck Schering-Plough respectivement), la Fostimon et la Menopur (FSH extraites commercialisées par les laboratoires Genevrier et Merck Schering-Plough respectivement).

35

Comme décrit dans le protocole de Steelman et Pohley, des rattes immatures de 21 jours ont reçu pendant trois jours consécutifs 2 injections matin et soir, de 100 µl d'un mélange de hCG et FSH comportant une quantité constante de hCG (3,5 UI) additionnée d'une quantité variable de FSH allant de 0,5 à 1,5 UI pour la FSH humaine (Gonal F, Puregon, Fostimon, Menopur) ou de 0,5 à 2 µg pour la FSH ovine (hormone extraite). Les injections ont été réalisées par voie sous-cutanée au niveau de la nuque. Chaque expérience comprenait au minimum 4 lots : un lot traité avec du sérum physiologique (sérum Φ), un lot traité avec l'anticorps ou le scFv seul, un lot traité avec le mélange hCG+FSH, un lot traité avec le mélange hCG/FSH additionné de 2 µg d'anticorps ou de scFv purifié.

Dans le cas d'un traitement avec le complexe hormone/anticorps ou scFv, avant l'injection, le mélange FSH + anticorps a été préalablement incubé 20 min à 37°C ou à température ambiante indifféremment, puis ajouté à la hCG. La hCG peut indifféremment être mélangée à la FSH pendant l'incubation du complexe.

Le quatrième jour, les rattes ont été pesées, et leurs ovaires ont été prélevés, disséqués puis pesés. Les résultats sont exprimés en milligramme d'ovaire/100 grammes de poids corporel. L'augmentation du poids des ovaires est proportionnelle à la quantité de FSH bioactive injectée. Ceci permet de quantifier et de comparer la bioactivité d'une même quantité d'hormone injectée seule ou en complexe avec un anticorps.

La comparaison de la bioactivité de la FSH injectée seule ou complexée à l'anticorps ou au scFv permet de mesurer le différentiel de la réponse et de quantifier ainsi l'effet potentialisant de l'anticorps ou de son scFv.

25

Effet de l'anticorps CA5 et de son scFv

La figure 14A illustre un exemple représentatif de l'effet de l'anticorps CA5 sur la bioactivité FSH ovine. Chaque lot comportait 5 femelles. Le lot traité avec l'anticorps CA5 injecté seul a présenté un même poids moyen des ovaires que les femelles du lot contrôle ayant reçu du sérum physiologique (25,6 mg et 29,15 mg respectivement). Le lot ayant reçu le traitement hormonal classique (hCG 3,5 UI +oFSH 0,5 µg) a donné un poids moyen des ovaires de 85,7 mg significativement plus élevé que le lot contrôle ($p < 0.05$). Le lot traité avec la FSH ovine préalablement complexée à l'anticorps CA5 a présenté un poids moyen de 198 mg soit une augmentation très significative de la bioactivité FSH de 231% par

35

rapport au lot ayant reçu le traitement hormonal classique ($p < 0.0001$). L'effet potentialisant de CA5 sur l'activité de la FSH ovine, *in vivo*, a été analysé sur plusieurs expériences dont l'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 40. L'augmentation du poids moyen des ovaires, enregistré sur trois expériences, suite à une stimulation avec le complexe hormone / CA5 est hautement significative ($p < 0.0001$).

Tableau 40

lot	Moyenne \pm sem	effectif	statistiques
Sérum Φ	25,6 \pm 2,4	13	NS
CA5	29,15 \pm 4,6	15	
hCG+oFSH	98,12 \pm 6,37	13	***
hCG+oFSH+CA5	165,8 \pm 11,54	12	$p < 0.0001$

L'effet de CA5 sur les FSH humaines a également été analysé sur un effectif important au cours de plusieurs expériences. Les résultats sont présentés dans le tableau 41 ci-dessous.

Tableau 41

lot	Moyenne \pm sem	effectif	statistiques
hCG+hFSH	73,93 \pm 1,525	77	***
hCG+hFSH+CA5	128,3 \pm 4,323	80	$p < 0.0001$

L'augmentation du poids des ovaires moyen enregistrée chez les femelles traitées par le complexe hFSH Gonal F / CA5 est de 173% : le poids moyen des ovaires passe de 73,93 mg chez les femelles ayant reçu un traitement classique à 128,3 mg chez les femelles ayant été traitées avec le complexe hormone/CA5. Cette différence est hautement significative ($p < 0,0001$, test-t non apparié).

Enfin, l'effet potentialisant a été étudié sur deux autres préparations de FSH humaine (Puregon et Fostimon). Les résultats illustrés sur la figure 14B sont un exemple représentatif. Une augmentation significative de 153% a été enregistrée sur l'activité de la FSH humaine Puregon ($p < 0,05$) et de 142% sur l'activité de la FSH humaine Fostimon (NS). Par comparaison, l'augmentation sur l'activité de la FSH humaine Gonal F a été de 179% dans cette expérience ($p < 0,05$).

En conclusion, l'anticorps CA5 exerce un effet potentialisant majeur sur la FSH ovine et un effet potentialisant également important sur l'activité de la FSH humaine, provenant de différentes préparations pharmaceutiques.

L'effet du scFv CA5 a été étudié dans le même protocole que l'anticorps entier. La figure 15A illustre les résultats obtenus. Un même effet potentialisant

sur l'activité de la FSH humaine Gonal F a été obtenu avec l'anticorps entier ou avec son scFv de façon significative ($p < 0,05$).

Différents modes d'injection des mélanges hormone/ scFv ont été évalués et comparés avec le protocole classique (injection par voie sous-cutanée). Ainsi un bioassay a visé à comparer une injection du mélange hormonal par voie intra-péritonéale avec une injection du mélange hormonal par voie intra-péritonéale suivie d'une deuxième injection différée du scFv CF12 15 minutes plus tard (figure 15A). Dans ce cas, une augmentation de 146% a été obtenue chez les femelles traitées avec le complexe hormone/scFv avec un poids moyen des ovaires passant de 61 mg (lot hCG+hFSH Gonal F) à 89 mg (lot scFv puis hCG+hFSH Gonal F). Ces résultats sont importants car ils démontrent que l'effet potentialisant du scFv CA5 peut se mettre en place *in vivo* même si le scFv est injecté seul, indépendamment de l'hormone et en différé. Le complexe hormone / scFv pouvant se constituer *in vivo* chez l'animal traité.

L'effet potentialisant du scFv CA5 a également été étudié sur l'activité des FSH humaines Fostimon et Puregon (Figure 15B). Une augmentation significative de 140% a été obtenue sur l'activité de la FSH Fostimon ($p < 0,05$) et une augmentation non significative de 126% sur l'activité de la FSH Puregon (NS).

20 **Effet de l'anticorps CH10 et de son scFv**

L'effet potentialisant de CH10 sur l'activité de la FSH ovine, *in vivo*, a été analysé au cours de plusieurs expériences dont l'ensemble des résultats est présenté sur la Figure 16A. La comparaison sur trois expériences de la réponse entre les rattes traitées, avec le mélange hCG+oFSH et celles traitées avec le complexe hormones / CH10 met en évidence une augmentation significative de 145% ($p < 0,01$). Le poids moyen des ovaires enregistré a été de $87,55 \pm 3,724$ mg chez les femelles traitées avec le mélange hCG+oFSH ($n=12$) à $126,6 \pm 9,6$ mg/100gr de poids corporel chez les rattes traitées avec le complexe hormone / CH10 ($n=13$). On n'a observé aucun effet de l'anticorps CH10 seul sur la réponse ovarienne.

L'effet potentialisant de CH10 sur la FSH humaine Gonal-F a également été analysé sur un effectif important au cours de plusieurs expériences. Les résultats sont présentés dans le tableau 42 ci-dessous et sur la Figure 16B.

Tableau 42

lot	Moyenne \pm sem	effectif	statistiques
-----	-------------------	----------	--------------

hCG+hFSH GONAL F	73,93 ± 1,525	77	*** p<0.0001
hCG+hFSH Gonal F+CA5	128,3 ± 4,323	80	

Une augmentation de 170% du poids des ovaires moyen a été enregistrée chez les femelles traitées par le complexe Gonal F/CH10. Cette différence est hautement significative ($p < 0.0001$, test-t non apparié).

L'effet potentialisant de CH10 a également été recherché sur les FSH humaines Puregon et Fostimon (Figure 17A). Une augmentation significative de 145% et 174% respectivement a été obtenue respectivement ($p < 0,0001$).

La figure 17B illustre l'effet du complexe hFSH Gonal F / scFv CH10 en injection classique par voie sous-cutanée et en injection différée en temps par voie intra-péritonéale. Une augmentation significative de 160% ($p < 0,05$) a été obtenue par injection classique et une augmentation de 150%, bien que non-significative, par injections indépendantes du scFv CH10 et de la hFSH par voie intra-péritonéale. L'effet potentialisant du scFv CH10 peut donc se mettre en place *in vivo*, que celui-ci soit injecté séparément ou préincubé avec l'hormone.

15 **Effet potentialisant de l'anticorps CF12 et de son scFv.**

L'effet *in vivo* de l'anticorps CF12, produit contre la FSH humaine, a été évalué sur la bioactivité de différentes préparations de FSH humaine et sur la bioactivité de la FSH ovine.

La figure 18A illustre l'effet potentialisant remarquable exercé par l'anticorps de CF12 sur trois préparations différentes de FSH humaine. Les résultats sont ceux de bioassays représentatifs comportant des lots de 5 femelles. L'analyse statistique entre lots a été faite par un test-t non-paramétrique (test de Mann-Whitney). Un effet potentialisant important et significatif a été enregistré sur l'activité de la hFSH Gonal-F avec une augmentation de 210% du poids moyen des ovaires (74 versus 155 mg/100g de poids corporel, $p < 0.001$). De même, sur la Puregon une augmentation de 190% a été obtenue (141 versus 224 mg, $p < 0.05$) ainsi que sur la Fostimon avec laquelle une augmentation de 160% du poids moyen des ovaires a été enregistré (85 versus 161 mg, $p < 0,05$).

Ces expériences ont été répétées entre 5 et 7 fois et les résultats ont été compilés ($n=40$ et 47 rattes pour les lots hCG+hFSH Gonal F et hCG+hFSH Gonal F+CF12). Un test paramétrique (test t de Student non apparié) suivi d'une correction de Bonferroni ont été appliqués. Comme illustré dans le tableau 43, elle fait apparaître une augmentation de 170% hautement significative entre le

5 poids moyen des ovaires chez les femelles traitées classiquement par le mélange hCG+hFSH (Gonal F) et celui mesuré chez les femelles traitées avec le complexe hFSH Gonal F/CF12 : le poids moyen augmentant de $79,51 \pm 2,178$ mg d'ovaire/100gr de poids corporel à $134,8 \pm 4,985$ mg d'ovaire/100gr de poids corporel chez les femelles (***, $p < 0,0001$).

Tableau 43

lot	Moyenne \pm sem	effectif	statistiques
Sérum physiologique	$29,68 \pm 5,88$	10	NS
CF12 2 μ g	$34,3 \pm 7,9$	12	
hCG+hFSH	$79,51 \pm 2,178$	40	*** $p < 0,0001$
hCG+hFSH+CA5	$134,8 \pm 4,985$	47	

Une même approche a été conduite pour évaluer et quantifier l'effet potentialisant de l'anticorps CF12 sur la FSH d'origine ovine.

10 La figure 18B illustre un exemple représentatif de bioassay obtenu (lots de 5 femelles) en traitant les rattes avec 0,5 μ g de FSH ovine + hCG ou avec hCG+ 0,5 μ g de FSH ovine pré complexée avec CF12. Une augmentation de 170% du poids moyen des ovaires a été obtenu chez les femelles traitées avec le complexe oFSH/CF12 + hCG par rapport à celles ayant reçu un traitement sans CF12 : le poids moyen des ovaires passant de 107 mg à 183 mg/100gr de poids corporel (**, $p < 0,01$).

15 La répétition de cette étude sur un effectif plus important ($n=10$) a confirmé de façon très significative l'effet potentialisant de CF12 sur la bioactivité de la oFSH (Tableau 44), le poids moyen augmentant de $115,5 \pm 7,45$ mg dans le cas du traitement classique à $166,4 \pm 9,54$ mg chez les traitées avec le complexe oFSH/CF12+ hCG (***, $p < 0,001$).

Tableau 44

lot	Moyenne \pm sem	effectif	statistiques
hCG+oFSH 0,5 μ g	$115,5 \pm 7,45$	10	*** $p < 0,001$
hCG+oFSH+CF12	$166,4 \pm 9,54$	10	

25 Le scFv CF12 développé à partir de la séquence des régions variables V_H et V_L de l'anticorps a été évalué de la même façon sur la bioactivité de la FSH humaine. Préalablement, plusieurs doses de scFv ont été évaluées de 0,06 μ g par injection (correspondant à une quantité équimolaire avec l'anticorps entier de $2,5 \cdot 10^{-9}$ mole) à 2 μ g par injection correspondant à la même quantité injectée que l'anticorps entier. La comparaison de différentes doses de scFv dans le bioassay

a mis en évidence qu'un effet potentialisant optimal est obtenu en injectant 2 µg de scFv par injection, soit $8 \cdot 10^{-8}$ mole.

Les résultats obtenus sur les différentes préparations de FSH humaines sont illustrés sur la Figure 19A. Ils montrent que les effets enregistrés avec le scFv sont très proches de ceux mesurés avec l'anticorps entier sur les trois préparations de FSH humaines. Le poids moyen des ovaires a été systématiquement plus élevé chez les rattes traitées avec le complexe hFSH/scFv/ CF12 + hCG comparativement à celles traitées classiquement avec hFSH+hCG. Ainsi une augmentation de 190% a été enregistrée sur la hFSH Gonal F (avec un poids moyen de 170 mg dans le lot +scFv CF12 versus 89 mg dans le lot sans scFv CF12, $p < 0,01$), une augmentation de 151% sur la hFSH Puregon (poids moyen de 130 mg dans le lot +scFv CF12 versus 86 mg dans le lot sans scFv, $p < 0,05$) et une augmentation de 148% sur la hFSH Fostimon (poids moyen de 114 mg dans le lot +scFv CF12 versus 77 mg dans le lot sans scFv, $p < 0,05$). L'analyse a été faite par un test-t non paramétrique (test de Mann-Whitney). Il est à noter que l'amplitude de l'augmentation de la réponse ovarienne est équivalente à celle obtenue avec l'anticorps CF12 entier (même facteur multiplicatif). Ce résultat significatif et majeur indique qu'un même effet potentialisant des gonadotropines circulantes peut être obtenu *in vivo* que ce soit par l'intermédiaire d'un scFv ou d'un anticorps entier, aboutissant à l'amplification d'une réponse physiologique tangible au niveau d'un organe.

Différents modes d'injection des mélanges hormone / anticorps ou scFv ont été évalués et comparés avec le protocole classique (injection par voie sous-cutanée) également dans le cas de CF12. Ainsi un bioassay a visé à comparer une injection du mélange hormonal par voie intra-péritonéale avec une injection du mélange hormonal par voie intra-péritonéale suivie d'une deuxième injection différée du scFv CF12 15 minutes plus tard. Les résultats sont présentés sur la Figure 19B, et indiquent une augmentation du poids des ovaires de 122% chez les femelles injectées par voie intra-péritonéale en deux temps : 1) avec le mélange hCG+hFSH puis 2) avec du scFv en injection différée 15 mn plus tard : 58,8 mg d'ovaire par 100 gr de poids corporel dans le lot hCG+hFSH Gonal F versus 72 mg d'ovaire par 100 gr de poids corporel dans le lot hCG+hFSH Gonal F suivi du scFv. La différence n'est pas significative entre les deux lots due au petit effectif mais les résultats indiquent une tendance à une potentialisation de la FSH en injectant l'hormone et le scFv en deux temps et à deux points d'injection

différents. Il est donc envisageable pour des applications ultérieures d'injecter l'hormone à potentialiser puis l'anticorps ou le scFv indépendamment en temps et en points d'injection différents.

Une autre modalité d'injection a été évaluée chez les animaux traités avec le complexe hormone/anticorps : l'un ayant une seule injection sous-cutanée de hCG+FSH+CF12 et l'autre ayant une première injection sous-cutanée de FSH+CF12 puis 15 minutes plus tard de hCG en sous-cutanée également. Les résultats illustrés sur la figure 19C montrent que l'effet potentialisant observé dans les deux cas n'est pas différent : 160 mg versus 159 mg d'ovaires/100 gr de poids corporel chez les femelles traitées avec l'anticorps CF12 pour un poids moyen de 83 mg d'ovaires pour le lot traité sans anticorps.

Effet potentialisant des anticorps sur la bioactivité de la LH/CG chez le Rat

En raison du coût très élevé de la LH ovine, ces dosages biologiques ont été réalisés avec de la hCG, facilement disponible, sous une forme très pure et peu onéreuse. L'effet des anticorps a été étudié sur deux préparations de hCG (human Chorionic Gonadotropin) humaines extraites, l'une utilisée en reproduction humaine dans le cadre des traitements de procréation médicalement assistée : l'ENDO 5000 (laboratoire Schering-Plough) et l'autre utilisée en médecine vétérinaire : la Chorulon (laboratoire MSD).

Selon le protocole de Scobey et collaborateurs [13], la bioactivité de la LH ou de la hCG a été quantifiée par rapport à l'augmentation du poids des vésicules séminales dont le développement est androgéno-dépendant. Le poids varie proportionnellement à l'activité de la hCG et permet donc de quantifier et comparer l'activité biologique de l'hormone injectée seule ou complexée avec l'anticorps étudié. Le protocole a été réalisé avec des ratons de 25 jours qui ont été injectés par voie sous-cutanée, une fois par jour pendant quatre jours avec 100 µl de 1,5 UI de hCG ou d'un mélange 1,5 UI hCG + 2 µg d'anticorps préalablement incubé 20 mn à 37°C. Le cinquième jour, les rats ont été pesés puis sacrifiés. Leurs vésicules séminales (VS) ont été prélevées, disséquées et pesées. Le poids des vésicules séminales est exprimé en mg/100g de poids corporel afin de pouvoir comparer et réunir les résultats obtenus avec différents lots. Dans chaque expérience, chacune des conditions a été testée sur un lot de 5 rats. Une même expérience a été répétée plusieurs fois.

L'effet de CA5 sur les deux préparations de hCG : Chorulon et Endo 5000 est illustré sur la figure 20. L'histogramme A est un exemple représentatif d'un bioassay réalisé sur 6 lots de 5 rats. Un effet potentialisant très significatif ($p < 0,0001$, test de Krustal et Wallis) a été obtenu avec le complexe hCG Chorulon / CA5 avec une augmentation de 196% du poids des vésicules séminales par rapport au lot traité avec hCG seule. Un effet significatif a également été obtenu avec le complexe hCG ENDO 5000 / CA5 avec une augmentation du poids de 193% ($p < 0,01$). On observe que le lot traité avec l'anticorps CA5 seul ne présente aucun changement du poids des vésicules séminales par rapport aux animaux contrôles traités avec du sérum physiologique : l'anticorps seul n'exerce aucun effet sur l'organe cible contrairement au complexe.

La somme des résultats obtenus au cours des répétitions de ce bioassay avec les deux hCG confirme un effet potentialisant hautement significatif ($p < 0,0001$, Test-t non apparié) du complexe hormone / CA5 :

- sur un effectif de 53 et 56 animaux respectivement, le poids moyen des VS a été de 28,8 mg/100 g chez les rats traités avec hCG Chorulon et 46,7 mg/100 g chez les rats traités avec le complexe (augmentation de 162%) (Figure 20B)
- sur un effectif de 26 et 30 animaux respectivement, le poids moyen des VS a été de 24,64 mg/100 g chez les rats traités avec hCG ENDO 5000 et 48,13 mg/100 g chez les rats traités avec le complexe (augmentation de 195%) (Figure 20C).

L'anticorps CH10 a présenté également un effet potentialisant significatif sur la hCG Chorulon et la hCG ENDO 5000, *in vivo*, chez le rat.

La figure 21A illustre un cas représentatif de bioassay réalisé sur 6 lots de 5 rats. Un effet potentialisant très significatif ($p < 0,0001$, test de Krustal et Wallis) a été obtenu avec le complexe hCG Chorulon / CH10 avec une augmentation de 193% du poids des vésicules séminales par rapport au lot traité avec hCG seule. Un effet significatif a également été obtenu sur le lot traité avec le complexe hCG ENDO 5000 / CA5 avec une augmentation du poids de 199% ($p < 0,0001$). On observe que le lot traité avec l'anticorps CH10 seul ne présente aucun changement du poids des vésicules séminales par rapport aux animaux contrôles traités avec du sérum physiologique. CH10 non complexé à l'hormone n'a donc aucun effet propre sur l'organe cible.

La compilation des résultats obtenus au cours des répétitions de ce bioassay avec les deux hCG confirme un effet potentialisant hautement significatif ($p < 0,0001$, Test-t non apparié) du complexe hormone / CH10 :

- sur un effectif de 34 et 35 animaux respectivement, le poids moyen des VS a été de 29,6 mg/100 g chez les rats traités avec hCG Chorulon contre 50,04 mg/100 g chez les rats traités avec le complexe (augmentation de 169%) (Figure 21B)
- sur un effectif de 13 et 15 animaux respectivement, le poids moyen des VS a été de 24,64 mg/100 g chez les rats traités avec la hCG ENDO 5000 et 51,39 mg/100 g chez les rats traités avec le complexe (augmentation de 208%) (Figure 21C).

Les figures 22A, B, C illustrent les résultats obtenus chez les rats traités avec l'anticorps CF12 en complexe avec la hCG Chorulon et la hCG ENDO 5000.

- La figure 22A montre le résultat représentatif d'un bioassay réalisé sur 6 lots de 5 rats. Un effet potentialisant très significatif ($p < 0,0001$, test de Krustal et Wallis) a été obtenu avec le complexe hCG Chorulon / CF12 avec une augmentation de 220% du poids des vésicules séminales par rapport au lot traité avec hCG seule. Un effet significatif a également été obtenu sur le lot traité avec le complexe hCG ENDO 5000 / CA5 avec une augmentation du poids de 189% ($p < 0,0001$). On observe que le lot traité avec l'anticorps CF12 seul ne présente aucun changement du poids des vésicules séminales par rapport aux animaux contrôles traités avec du sérum physiologique. CF12 non complexé à l'hormone n'a donc aucun effet propre sur l'organe cible.

La compilation des résultats issus des différents bioassays réalisés avec CF12 est représentée sur les histogrammes B et C de la figure 22. Un effet potentialisant hautement significatif ($p < 0,0001$, Test-t non apparié) du complexe hormone / CF12 a été mesuré avec hCG Chorulon et hCG ENDO 5000:

- sur un effectif de 33 et 36 animaux respectivement, le poids moyen des VS a été de 29,36 mg/100 g chez les rats traités avec hCG Chorulon contre 51,40 mg/100 g chez les rats traités avec le complexe (augmentation de 175%) (Figure 22B)
- sur un effectif de 18 et 20 animaux respectivement, le poids moyen des VS a été de 25,35 mg/100 g chez les rats traités avec hCG ENDO 5000 et 50,54 mg/100 g chez les rats traités avec le complexe (augmentation de 208%) (Figure 22C).

EXEMPLE 4 : MESURE IN VIVO DE L'EFFET POTENTIALISANT DES LIGANDS DE L'INVENTION SUR LA BIOACTIVITE DES GONADOTROPINES ENDOGENES CHEZ LA BREBIS

5 Après avoir démontré et caractérisé l'effet potentialisant *in vivo*, des anticorps monoclonaux CA5, CH10 et CF12, chez un rongeur (animal de petite taille), l'objectif a été d'étudier l'effet de chaque anticorps sur l'activité de la FSH chez un animal de rente, de plus grande taille : la brebis.

10 Pour cela, une étude a été réalisée sur des brebis Ile de France, pubères, toutes du même âge, dans le but d'évaluer l'effet potentialisant des anticorps sur les propres hormones des brebis traitées (hormones endogènes). L'étude de la spécificité a montré en effet une forte liaison des anticorps CA5, CH10 et CF12 pour la FSH ovine et une liaison plus variable pour la LH ovine. Dans cet objectif, un traitement ne comprenant que l'injection d'un anticorps seul a été mis au point
15 pour en évaluer son efficacité.

 Dans les protocoles mis en place chez la brebis, chaque anticorps a donc été injecté seul et non préalablement incubé avec la FSH exogène comme cela a été réalisé dans les études chez la Ratte. De plus, chaque anticorps a été injecté chez des brebis indemnes de toute stimulation préalable de l'ovaire : les animaux
20 n'ont reçu aucun traitement hormonal de stimulation de l'ovulation avec une gonadotropine préalablement à l'injection de l'anticorps.

 L'effet potentialisant des anticorps anti-FSH CA5, CH10 et CF12 a été évalué au cours de protocoles réalisés en pleine saison sexuelle (janvier) ou en fin de saison sexuelle (fin du mois de mars). Les protocoles ont tous été réalisés
25 sur des brebis dont le cycle ovulatoire a été préalablement synchronisé par la pose d'une éponge vaginale imprégnée d'un progestagène (45 mg d'acétate de fluorogestone (FGA) – MSD) pendant 14 jours. L'effet potentialisant a été analysé en comparant la réponse ovulatoire (nombre d'ovulations) et la mise en place
30 d'un ou de plusieurs corps jaunes fonctionnels de bonne qualité (amplitude de la sécrétion de progestérone) chez des brebis contrôles (lot sérum physiologique), des brebis stimulées par un traitement de FSH porcine (lot FSH) et des brebis stimulées par un anticorps seul (lot anticorps).

 Dans chaque protocole, un dosage de la LH plasmatique a été réalisé par méthode ELISA afin de détecter et dater le pic pré-ovulatoire de LH. Pour évaluer
35 la réponse ovulatoire une observation endoscopique des ovaires a été réalisée

par laparoscopie, sous anesthésie, huit jours après le retrait de l'éponge vaginale, afin de compter le nombre de corps jaunes et observer leur aspect.

Pour évaluer la fonctionnalité et la qualité du ou des corps jaunes, un dosage ELISA quantitatif de progestérone a été réalisé à partir de prises de sang quotidiennes du premier au 21^{ème} jour après le retrait de l'éponge.

Toutes les analyses statistiques ont été faites avec le logiciel GraphPad Prism Version 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

Anticorps CA5

L'effet potentialisant de l'anticorps CA5 (IgG) a été évalué dans deux protocoles (1 et 2) en période de saison sexuelle et en fin de saison sexuelle.

Dans le protocole 1, réalisé en fin de saison sexuelle :

- le lot "anticorps CA5" (n=6) a reçu trois injections de CA5 purifié par voie intramusculaire : 2 mg 4 jours avant le retrait de l'éponge, 1 mg avant le retrait et 1mg au moment du retrait de l'éponge.

- le lot "contrôle" (n=5) a reçu une injection de sérum physiologique, par voie intramusculaire, 24h avant le retrait de l'éponge

- le lot "FSH" (n=5) a reçu une injection par voie intra-musculaire de 100 µg de FSH porcine (pFSH) 24h avant le retrait de l'éponge et de 90 µg 12h avant le retrait de l'éponge.

L'analyse de la réponse ovulatoire a donné les résultats présentés dans le tableau 45 ci-dessous.

Tableau 45

	Lot sérum Φ	Lot FSH	Lot CA5 seul	Statistiques
Nombre de brebis par lot	5	5	6	
Nombre de brebis ayant ovulé par lot	2/5 (40%)	2/5 (40%)	2/6 (35%)	NS
Nombre de corps jaunes par brebis ayant ovulé	1,5 ± 0,7	3 ± 2,8	1,5 ± 0,7	NS
Moment du pic de LH (heures après retrait)	72 ± 17	60 ± 0	78 ± 25	NS

L'analyse statistique a été faite par un test exact de Fisher.

Comparativement aux lots contrôle et FSH, les résultats obtenus dans le lot CA5 ne montrent pas d'effet significatif sur la réponse ovulatoire. Aucun des paramètres mesurés ne présentent de tendance.

5 Le profil de sécrétion de la progestérone au cours de la phase lutéale obtenue dans les trois lots, est illustré dans la figure 23. Pour chaque individu, les valeurs de concentration en progestérone (ng/ml) ont été normalisées par nombre de corps jaunes. Chaque courbe représente la moyenne des valeurs de progestérone obtenue chez les femelles de chaque lot à un temps t.

10 Un effet significatif de l'anticorps CA5 a été observé sur l'intensité de la sécrétion de progestérone par corps jaune et sur le début de sa mise en place (Figure 23A). On observe en effet sur la courbe CA5, par rapport aux courbes des lots FSH et sérum Φ , un début de sécrétion de progestérone dès J4 suivie d'une augmentation significative de la sécrétion qui se maintient tout au long de la phase lutéale jusqu'en fin de cycle. Les valeurs moyennes de progestérone à J10
15 sont de 1,38 ng/ml - 0,92 et 0,52 ng/ml respectivement pour les lots CA5, FSH et sérum Φ et de 2,58 – 1,7 et 1,18 ng/ml à J15. La comparaison des trois courbes a été faite par un test t non paramétrique apparié (test de Wilcoxon). Ainsi, la courbe du lot CA5 est plus élevée que la courbe du lot FSH et significativement différente ($p < 0.01$), de même avec la courbe du lot contrôle ($p < 0.001$).
20 La courbe du lot FSH est plus élevée et significativement différente de celle du lot contrôle ($p < 0.001$).

Pour quantifier cette augmentation significative et constante du niveau de sécrétion de la progestérone jusqu'en fin de cycle chez les brebis sous stimulation de CA5, un calcul d'aire sous la courbe (AUC) a été réalisé avec le
25 logiciel GraphPad Prism version 5.0. Les résultats sont illustrés sur la figure 23B et montrent que l'AUC de la courbe CA5 (23,61 unités arbitraires) tend à être plus élevée que l'AUC de la courbe sérum Φ (8 unités) mais cette différence n'est pas significative. De même, l'AUC de la courbe FSH (12 unités) n'est pas significativement différente de la courbe contrôle.

30 En conclusion, l'injection de CA5 chez des brebis donne les mêmes résultats qu'un traitement classique avec FSH en termes d'induction de l'ovulation mais permet la mise en place plus rapide de la sécrétion de progestérone et le maintien d'un corps jaune fonctionnel plus efficace avec un niveau circulant de progestérone plus élevé, garant d'un meilleur succès du développement

embryonnaire précoce et du maintien de la gestation (risque d'avortement diminué).

Dans le protocole 2, réalisé en saison sexuelle :

- 5 - le lot "anticorps CA5" (n=7) a reçu une seule injection par voie intra-musculaire de 2 mg d'anticorps CA5 24h avant retrait de l'éponge.
- le lot "contrôle" (n=9) a reçu une injection de sérum physiologique, par voie intramusculaire, 24h avant le retrait de l'éponge
- 10 - le lot "FSH" (n=11) a reçu une injection par voie intra-musculaire de 100 μ g de FSH porcine (pFSH) 24h avant le retrait de l'éponge et de 90 μ g 12h avant le retrait de l'éponge.

L'analyse de la réponse ovulatoire a donné les résultats présentés dans le tableau 46 ci-dessous. L'analyse statistique a été faite par un test exact de Fisher.

15

Tableau 46

	Lot sérum Φ	Lot FSH	Lot CA5 seul	Statistiques
Nombre de brebis par lot	9	11	7	
Nombre de brebis ayant ovulé par lot	4/9 (44%)	4/11 (36%)	7/7 (100%)	***, p<0.0001
Nombre de corps jaunes par brebis du lot	0,67 \pm 0,3	0,9 \pm 0,5	1,5 \pm 0,4	NS, p=0.06
Nombre de corps jaunes par brebis ayant ovulé	1,5 \pm 0,3	3 \pm 1,4	1,5 \pm 0,4	NS
Moment du pic de LH (heures après retrait)	64 \pm 13	56 \pm 7	57 \pm 4,4	NS

20

Comparativement aux lots contrôle et FSH, les résultats obtenus dans le lot CA5 montrent un effet très significatif de l'anticorps injecté seul sur la réponse ovulatoire. En effet, 100% des femelles (7/7) ayant reçu une injection de 2 mg d'anticorps ont ovulé contre 44% et 36% respectivement pour le lot sérum Φ et le lot FSH (p<0.0001, test exact de Fisher). Le nombre de corps jaunes obtenu par femelle sur l'effectif total du lot est de même supérieur dans le lot "CA5" et de façon presque significative (p=0.06, test t de Mann-Whitney) : 1,5 corps jaune versus 0,9 (FSH) et 0,67 (sérum Φ) respectivement. Le nombre moyen de corps

jaunes par femelle ayant ovulé n'est pas significativement différent entre les trois lots.

Le moment moyen d'apparition du pic de LH n'est pas significativement différent entre les trois lots. On observe malgré tout une tendance à moins de variabilité dans la venue du pic de LH (donc du moment de l'ovulation) dans le lot CA5 par rapport au lot FSH et surtout sérum Φ .

Le profil de sécrétion de la progestérone au cours de la phase lutéale suite à l'ovulation, est illustré dans la figure 24A. Pour chaque individu, les valeurs de concentration en progestérone (ng/ml) ont été normalisées par nombre de corps jaunes. Chaque courbe de la figure représente la moyenne des valeurs de progestérone obtenue chez les femelles de chaque lot. Un effet remarquable de l'anticorps CA5 a été observé sur l'intensité de la sécrétion de progestérone : une augmentation importante et très significative de la sécrétion de progestérone par corps jaune a été observée tout au long de la phase lutéale par rapport aux courbes du lot FSH et du lot sérum Φ . Les valeurs moyennes à J10 sont de 2,44 ng/ml, 1,3 et 0,62 ng/ml respectivement pour les lots CA5, FSH et sérum Φ , et de 2,88 – 1,42 et 1,18 ng/ml à J15. La comparaison des trois courbes a été faite par un test t non paramétrique apparié (test de Wilcoxon). La courbe du lot CA5 est significativement plus élevée et différente de la courbe du lot FSH ($p < 0,01$), de même avec la courbe du lot contrôle ($p < 0,001$). La courbe du lot FSH est significativement différente de celle du lot contrôle ($p < 0,001$).

Pour quantifier cette augmentation remarquable et constante du niveau de sécrétion de la progestérone par corps jaune tout au long de la phase lutéale du cycle chez les brebis sous stimulation de CA5, un calcul d'aire sous la courbe (AUC) a été réalisé avec le logiciel GraphPad Prism version 5.0. Les résultats sont illustrés sur la figure 24B et montrent que l'AUC de la courbe CA5 (24,20 unités) est significativement plus élevé d'un facteur 3 de l'AUC de la courbe sérum Φ (8,1) ($p < 0,05$, test t non paramétrique de Mann-Whitney). A l'inverse, l'AUC de la courbe FSH n'est pas significativement différente de la courbe contrôle.

En conclusion, l'utilisation de l'anticorps CA5 sous forme d'une seule injection intra-musculaire de 2 mg a donné de façon très significative de meilleurs résultats qu'un traitement classique avec FSH en permettant :

1- l'induction de l'ovulation chez 100% des femelles stimulées

2- le développement de corps jaunes de meilleure qualité avec une sécrétion de progestérone très supérieure à celle observée suite à un traitement FSH et une mise en place très rapide dès J4. Il est à souligner que l'impact de cette propriété supplémentaire de CA5 par rapport à un traitement FSH est très important. En effet, la concentration plasmatique de progestérone est un facteur clé du développement embryonnaire, particulièrement dans ses phases précoces.

La mise en place plus rapide de la sécrétion de progestérone et le maintien d'un corps jaune fonctionnel plus efficace avec un niveau circulant de progestérone plus élevé est le garant d'un meilleur succès du développement embryonnaire précoce et du maintien de la gestation avec un risque d'avortement diminué.

Anticorps CF12 et son scFv

L'effet potentialisant de CF12 (IgM) et de son scFv ont été étudiés et comparés en utilisant les paramètres de mesure de l'ovulation et de la qualité fonctionnelle du corps jaune mis en place. Les doses injectées ont été de 2 fois 1 mg.

Le protocole réalisé en saison sexuelle comportait quatre lots :

- le lot anticorps CF12 (n=7) a reçu une injection intra-musculaire de 1 mg d'anticorps 24h avant retrait de l'éponge et une deuxième injection de 1 mg au moment du retrait de l'éponge
- le lot scFv CF12 (n=5) a reçu une injection intra-musculaire de 1 mg de scFv 24h avant retrait de l'éponge et une deuxième injection de 1 mg au moment du retrait de l'éponge
- le lot "contrôle" (n=9) a reçu une injection de sérum physiologique, par voie intramusculaire, 24h avant le retrait de l'éponge et au moment du retrait
- le lot "FSH" (n=11) a reçu une injection par voie intra-musculaire de 100 µg de FSH porcine (pFSH) 24h avant le retrait de l'éponge et de 90 µg 12h avant le retrait de l'éponge.

Les endoscopies des ovaires ont été réalisées 8 jours après retrait de l'éponge.

Des prises de sang quotidiennes du 1^{er} au 21^{ème} jour après retrait de l'éponge ont été faites pour doser la progestérone plasmatique par dosage ELISA.

L'analyse de la réponse ovulatoire a donné les résultats présentés dans le tableau 47 ci-dessous. L'analyse statistique a été faite par un test exact de Fisher.

Tableau 47

	Lot sérum Φ	Lot FSH	Lot CF12 seul	Lot scFv CF12 seul
Nombre de brebis par lot	9	11	7	5
Nombre de brebis ayant ovulé par lot	4/9 (44%)	4/11 (36%)	7/7 (100%) ***	5/5 (100%) ***
Nombre de corps jaunes par brebis totales	0,67 \pm 0,3	0,9 \pm 0,5	1,7 \pm 0,4	2,2 \pm 0,4 *
Nombre de corps jaunes par brebis ayant ovulé	1,5 \pm 0,3	3 \pm 1,4	1,7 \pm 0,4	2,2 \pm 0,4
Moment du pic de LH (heures après retrait)	64 \pm 13	56 \pm 5	52 \pm 3,2	51,6 \pm 4

5 *, p<0.05 ; ***, p<0.0001

Comparativement aux lots contrôle et FSH, les résultats obtenus dans le lot CF12 et scFv CF12 montrent un effet très significatif de l'anticorps ou de son scFv injecté seul sur la réponse ovulatoire. En effet, 100% des femelles (7/7 pour CF12 et 5/5 pour le scFv CF12) ayant reçu deux injections de 1 mg d'anticorps ou de scFv ont ovulé contre 44% et 36% respectivement pour le lot sérum Φ et le lot FSH (p<0.0001, test exact de Fisher). Le nombre de corps jaunes obtenus par femelle sur l'effectif total du lot est significativement supérieur dans le lot scFv CF12 (p<0.05, test de Kruskal Wallis) par rapport aux lots FSH et sérum Φ : 2,2 corps jaunes versus 0,9 (FSH) et 0,67 (sérum Φ) respectivement. Il n'y a pas de différence significative entre le lot scFv CF12 et CF12.

15 Le moment moyen d'apparition du pic de LH n'est pas significativement différent entre les trois lots. On observe malgré tout une tendance à moins de variabilité dans la venue du pic de LH (donc du moment de l'ovulation) dans les lots CF12 et scFv CF12 par rapport aux lots FSH et surtout sérum Φ . Dans cette hypothèse, ceci indiquerait une meilleure synchronisation des ovulations chez les brebis ayant reçu l'anticorps ou son scFv.

20 Le profil de sécrétion de la progestérone au cours de la phase lutéale suite à l'ovulation, dans les différents lots est illustré dans la figure 25A. Pour chaque individu, les valeurs de concentration en progestérone (ng/ml) ont été

normalisées par nombre de corps jaunes. Chaque courbe de la figure représente la moyenne des valeurs de progestérone mesurée à chaque prélèvement chez les femelles de chaque lot. Les courbes de sécrétion obtenues avec les lots CF12 et scFv CF12 sont très nettement au-dessus des lots FSH et sérum Φ . Les résultats obtenus indiquent des valeurs moyennes de progestérone de 1,46 – 1,4 – 1,1 et 0,6 ng/ml respectivement pour les lots scFv CF12, CF12, FSH et sérum Φ à J10 après retrait de l'éponge et de 1,93 - 1,78 – 1,22 et 1 ng/ml à J15.

La comparaison des quatre courbes a été faite par un test t non paramétrique apparié (test de Wilcoxon). Les courbes des lots CF12 et scFv CF12 sont significativement différentes de la courbe du lot sérum Φ ($p < 0.01$). De même, la courbe du lot FSH est significativement différente de celle du lot contrôle ($p < 0.001$). La différence entre les courbes des brebis traitées avec CF12 et scFv CF12 avec la courbe des brebis traitées avec FSH n'est pas significative et représente donc une tendance.

Une analyse de l'aire sous la courbe (AUC) a été réalisée avec le logiciel GraphPad Prism version 5.0 pour quantifier les différences entre courbes de sécrétion de la progestérone. Les résultats sont illustrés sur la figure 25B et indiquent que l'AUC de la courbe scFv CF12 (16,98 unités) est significativement plus élevé d'un facteur 1,55 de l'AUC de la courbe sérum Φ (8 unités) ($p < 0.01$, test t non paramétrique de Mann-Whitney). De même, l'AUC des courbes CF12 (16,78 unités) et sérum Φ (8 unités) sont significativement différentes ($p < 0.05$, test t non paramétrique de Mann-Whitney). Par contre, il n'y a pas de différence significative entre AUC de la courbe FSH (10,82 unités) et de la courbe sérum Φ indiquant que le traitement avec CF12 ou avec le scFv CF12 est plus efficace que le traitement avec FSH, dans le cadre de cette expérience.

En conclusion, l'ensemble des résultats indiquent que le fragment monovalent de CF12 a les mêmes effets potentialisants que l'anticorps bivalent CF12. Il n'a jamais été observé de différence significative entre les réponses des deux lots de brebis concernées. Le traitement avec l'une ou l'autre des deux molécules sous forme de deux injections intra-musculaires de 1 mg chacune a donné de façon très significative de meilleurs résultats qu'un traitement classique avec FSH :

- en termes d'efficacité sur l'induction de l'ovulation (100% des brebis ont ovulé et 1,3 et 0,8 corps jaunes supplémentaires sont obtenus par brebis sur l'effectif total)

- en termes de qualité des corps jaunes mis en place avec une sécrétion de progestérone plus élevée tout au long de la phase lutéale.

5 L'ensemble des résultats indique que les anticorps potentialisants, particulièrement CA5 et CF12, injectés *in vivo* chez la brebis sont capables de complexer les hormones gonadotropes endogènes de l'animal et de potentialiser l'activité biologique des hormones propres à l'animal.

10 L'effet potentialisant de l'anticorps CA5 chez la brebis est capable d'induire une stimulation de l'ovaire plus forte que le traitement hormonal FSH classique : l'induction des ovulations est de 100% en saison sexuelle et dans tous les cas une augmentation importante de la concentration circulante de la progestérone, de 200 à 300% est maintenue tout au long de la phase lutéale. Cet effet supplémentaire est majeur pour diminuer les taux d'échec du développement embryonnaire progestagène dépendant et les risques d'avortement.

15 Il a été montré que le fragment monovalent scFv de CF12 induit les mêmes effets potentialisants que l'anticorps entier aussi bien sur l'induction de l'ovulation que sur la qualité du corps jaune et l'augmentation de la sécrétion de progestérone chez la brebis. De plus, nous avons constaté que l'injection du scFv CF12 dans notre protocole n'a pas induit de sécrétion d'anticorps anti-scFv CF12
20 chez les brebis traitées. La perspective d'une utilisation de fragment monovalent diminue donc les risques de réponse immunitaire humorale pouvant être induite chez certaines brebis.

Listes des références

- 1- Brevet EP 1518863
- 2- Demande Internationale WO 2012/066519
- 5 3- Brochet et al., Nucl. Acids Res., 36 : W503-508, 2008
- 4- Giudicelli et al., Cold Spring Harb Protoc., 2011(6) : 695-715, 2011
- 5- Giudicelli et al., Nucl. Acids Res., 33 : D256-261, 2005
- 6- Corpet, Nucl. Acids Res., 16(22) : 10881-10890, 1988
- 7- Ward et al. Nature, 341 : 544-546, 1989)
- 10 8- Li et al., Afr. J. Biotechnol., 9(50) : 8549-8554, 2010
- 9- Chopineau et al., Mol. Cell Endocrinol., 92(2) : 229-239, 1993
- 10- Wehbi et al., Endocrinology, 151(6) : 2788–2799, 2010
- 11- Reverchon et al., Human Reprod., 27(6) : 1790-1800, 2012
- 12- Steelman SL, Pohley FM., Endocrinology, 53 :604-616, 1953
- 15 13- Scobey et al, Reprod. Biol. Endocr. 3 :61, 2005

REVENDEICATIONS

1. Ligand de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) potentialisant la
5 bioactivité de la FSH, de l'hormone lutéinisante (LH) et de la gonadotropine
chorionique (CG), caractérisé en ce que ledit ligand est un anticorps ou un
fragment de celui-ci et en ce que :

le domaine variable de la chaîne lourde contient les CDRs suivants :

- VH-CDR1, défini par la séquence GFTFSSSY (SEQ ID NO : 23) ;
- 10 - VH-CDR2, défini par la séquence IYAGTGGT (SEQ ID NO : 24) ;
- VH-CDR3, défini par la séquence ARHGSYFDY (SEQ ID NO : 25) ; et

le domaine variable de la chaîne légère contient les CDRs suivants :

- VL-CDR1, défini par la séquence QSDYDGDYSY (SEQ ID NO : 26) ;
- VL-CDR2, défini par la séquence AAS ;
- 15 - VL-CDR3, défini par la séquence QQSNEDPYT (SEQ ID NO : 27).

2. Ligand selon la revendication 1, caractérisé en ce que le ligand est
choisi dans le groupe constitué de Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, dsFv, scFv, diabodies,
20 triabodies, tétrabodies et nanobodies.

3. Ligand selon la revendication 1, caractérisé en ce que le ligand est
l'anticorps monoclonal CF12 produit par l'hybridome CNCM I-4803.

4. Ligand selon la revendication 2, caractérisé en ce que la séquence
25 peptidique du scFv est la séquence SEQ ID NO : 33.

5. Ligand selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, pour une
utilisation comme médicament.

6. Complexe ligand-gonadotrophine choisi parmi :
30 un complexe d'un ligand selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 avec
la FSH ou un peptide actif de celle-ci ;
un complexe d'un ligand selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 avec
la LH ou l'hormone gonadotropine chorionique (CG) ou un peptide actif de
35 celles-ci.

7. Complexe selon la revendication 6, pour utilisation comme médicament.

5 8. Ligand selon la revendication 5 ou complexe selon la revendication 7, où ledit médicament est destiné à induire l'ovulation ou une polyovulation chez un mammifère femelle.

10 9. Ligand selon la revendication 5 ou complexe selon la revendication 7, où ledit médicament est destiné à augmenter le taux de progestérone endogène circulant chez un mammifère femelle.

15 10. Composition pharmaceutique destinée à être utilisée pour l'induction de l'ovulation ou d'une polyovulation chez un mammifère femelle, caractérisée en ce qu'elle comprend un ligand selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et/ou un complexe selon la revendication 6 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

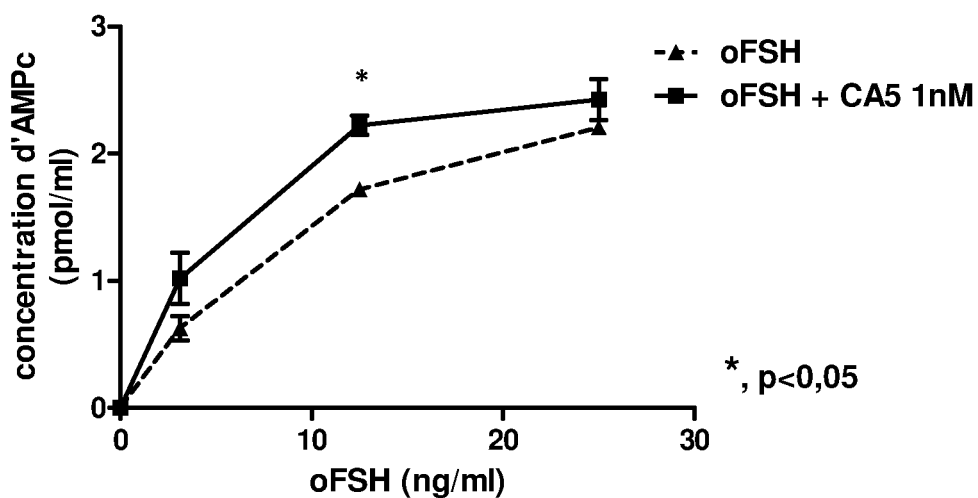
20 11. Composition pharmaceutique selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre une FSH et/ou une LH et/ou une CG.

25 12. Ligand selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou complexe selon la revendication 6, pour une utilisation dans le traitement et/ou la prévention de l'infertilité ou de l'hypofertilité chez un mammifère.

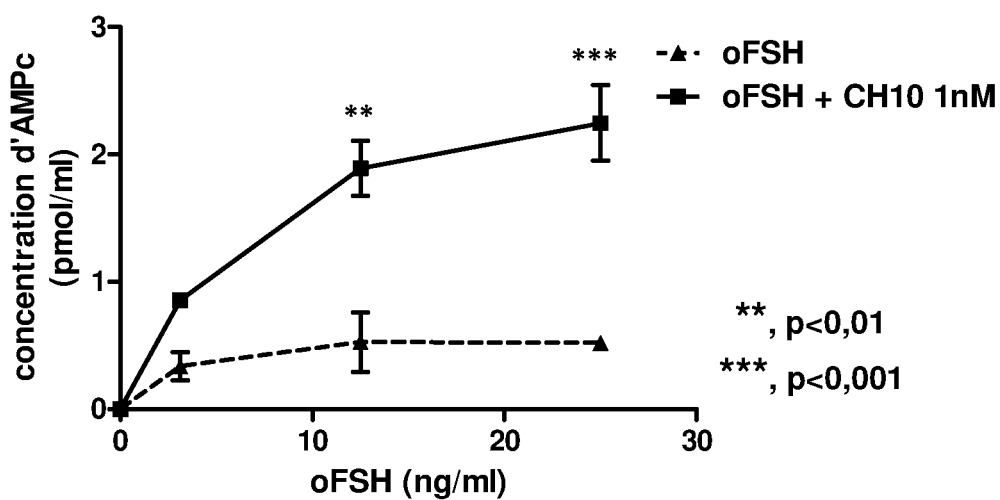
30 13. Ligand selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou complexe selon la revendication 6, pour une utilisation pour stimuler la procréation chez un mammifère femelle.

1/31

A



B



C

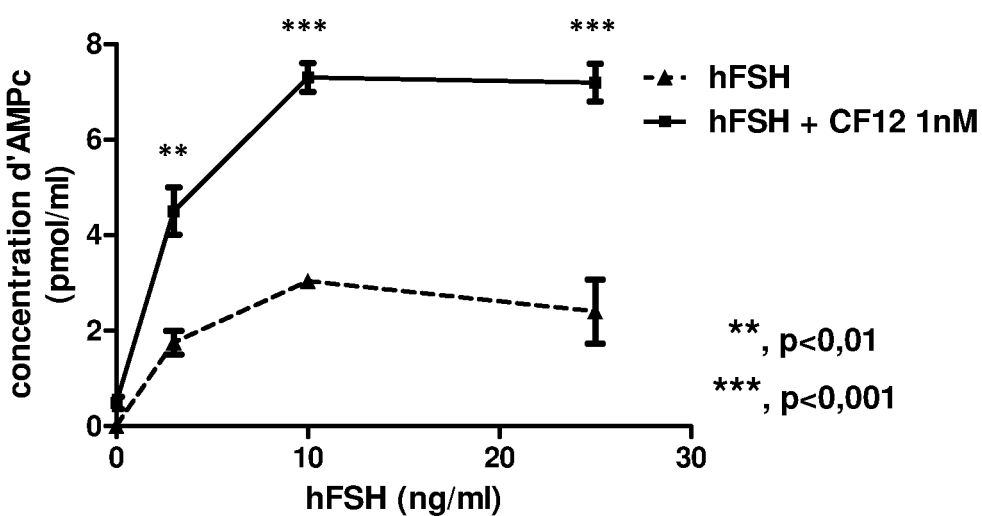
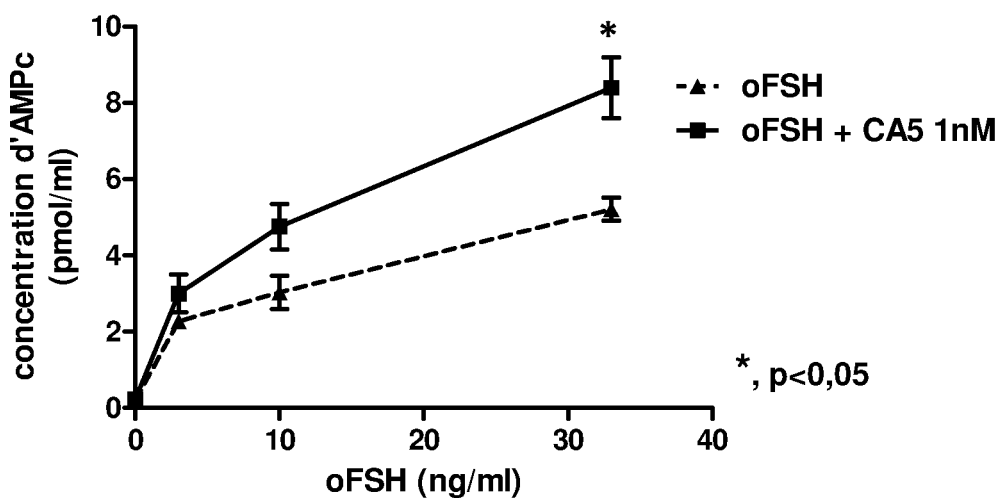


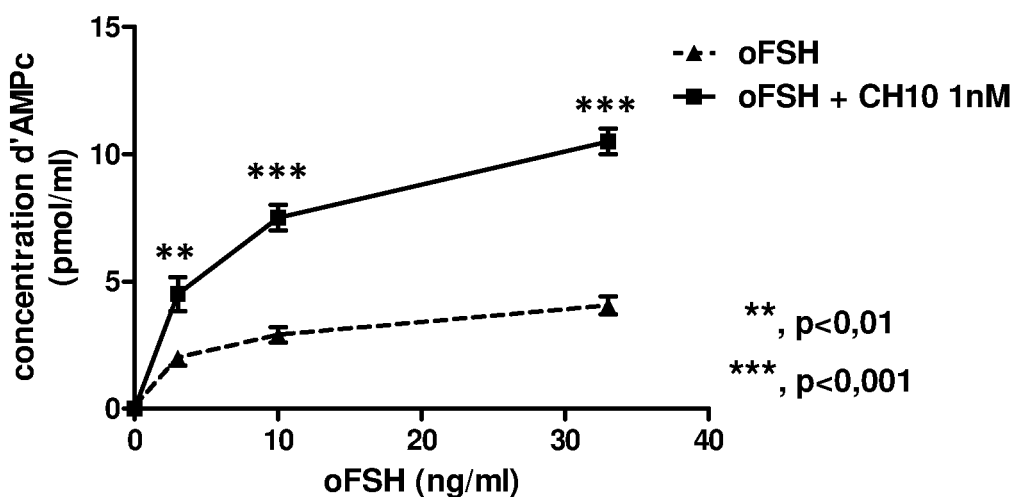
FIGURE 1

2/31

A



B



C

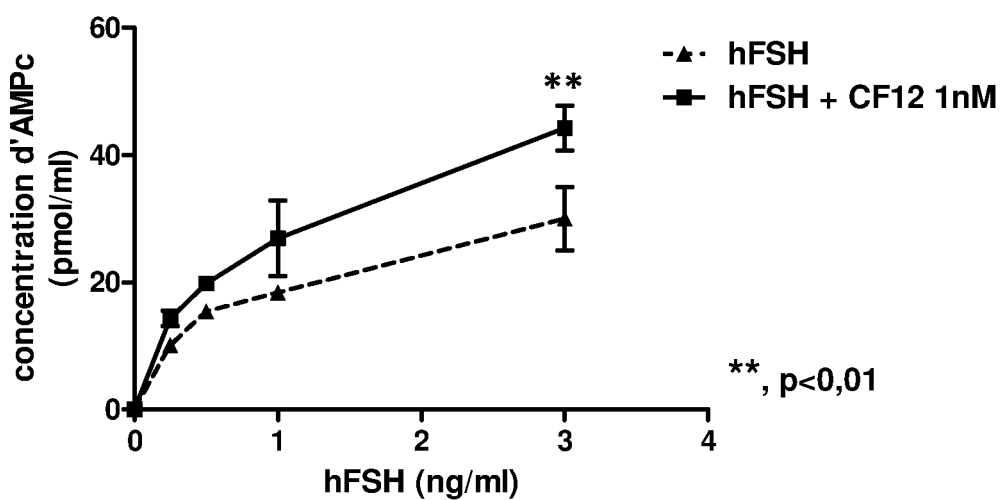
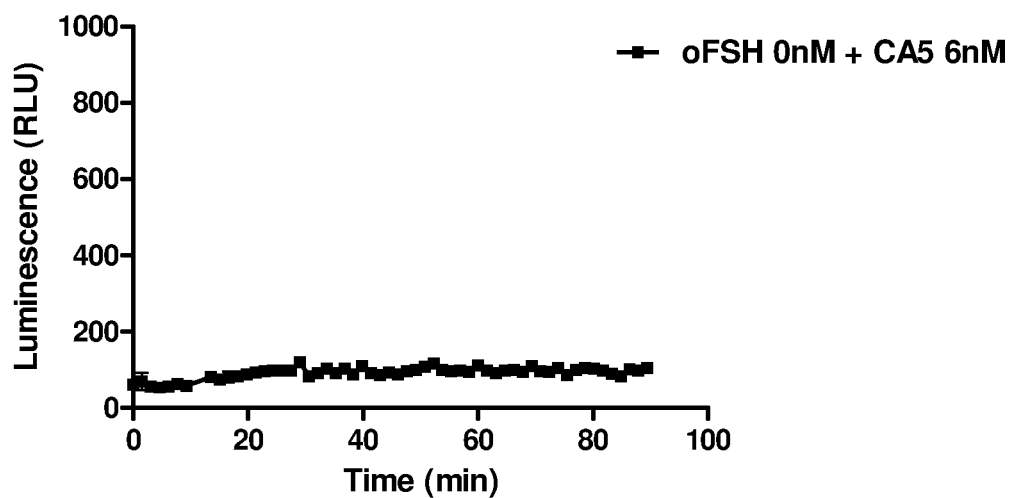


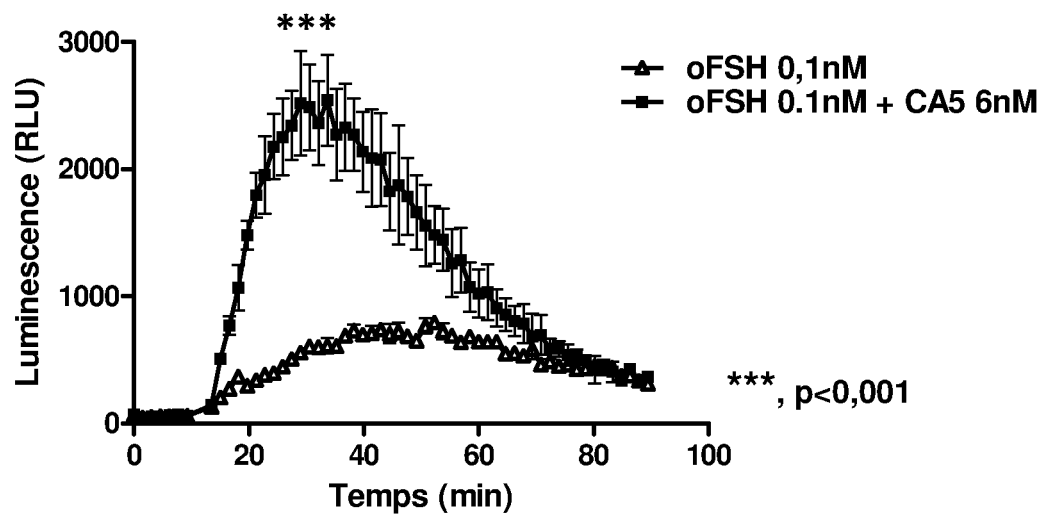
FIGURE 2

3/31

A



B



C

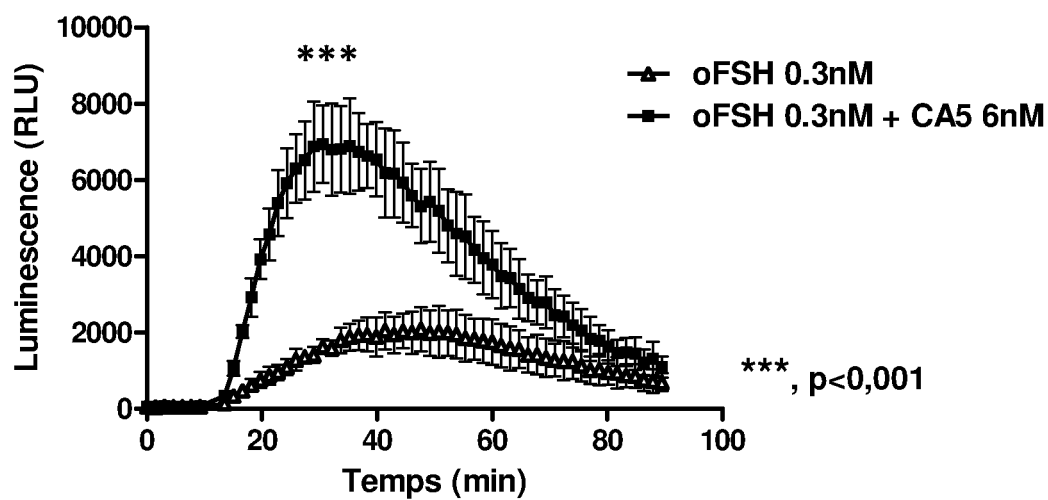
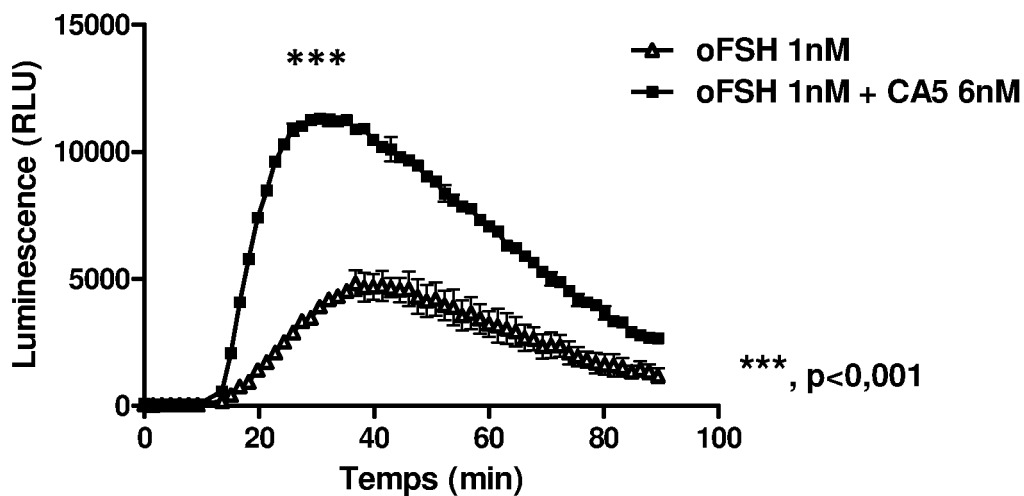


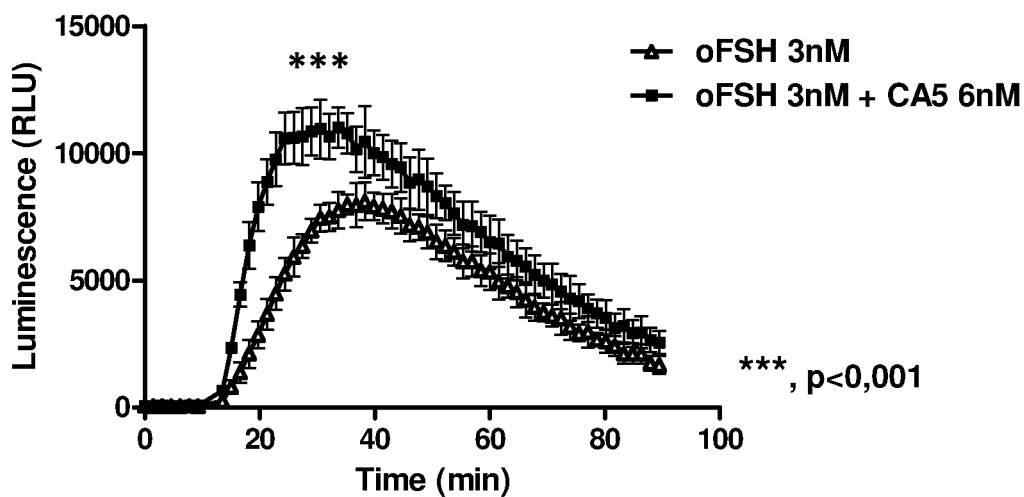
FIGURE 3

4/31

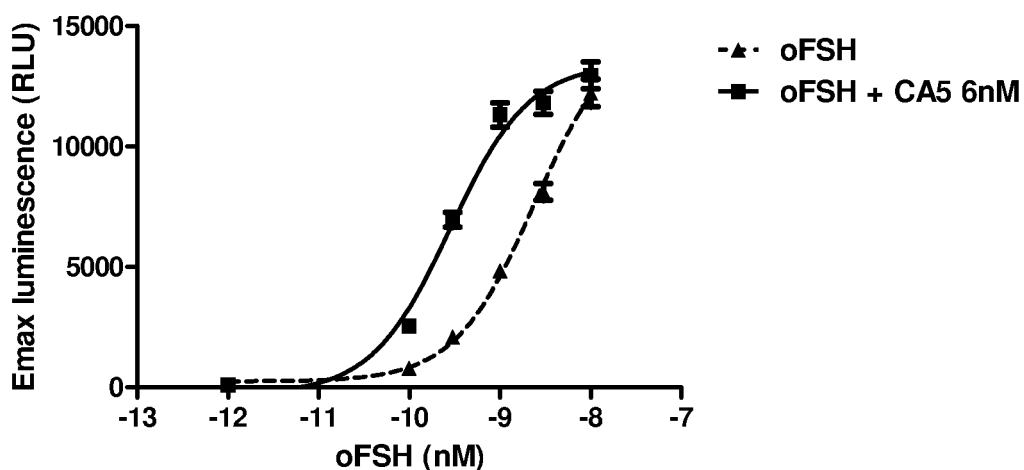
D



E



F

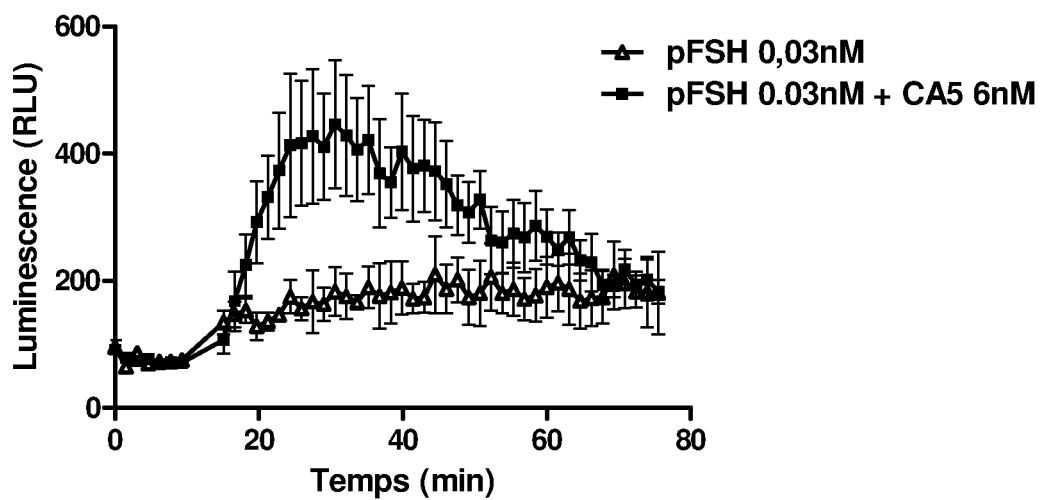


	oFSH	oFSH + CA5 6nM
LogEC50	-8.626	-9.547
EC50	2.365e-009	2.836e-010

FIGURE 3 (fin)

5/31

A



B

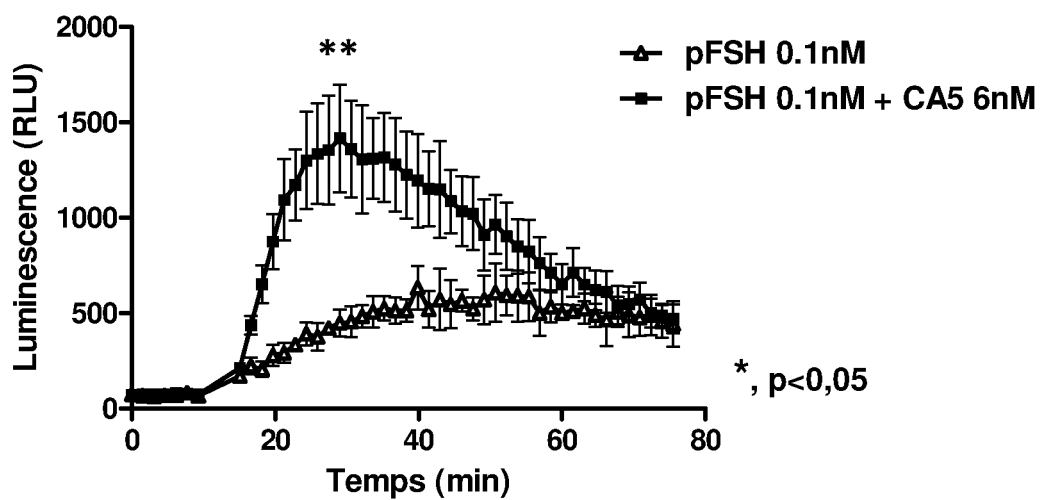


FIGURE 4

6/31

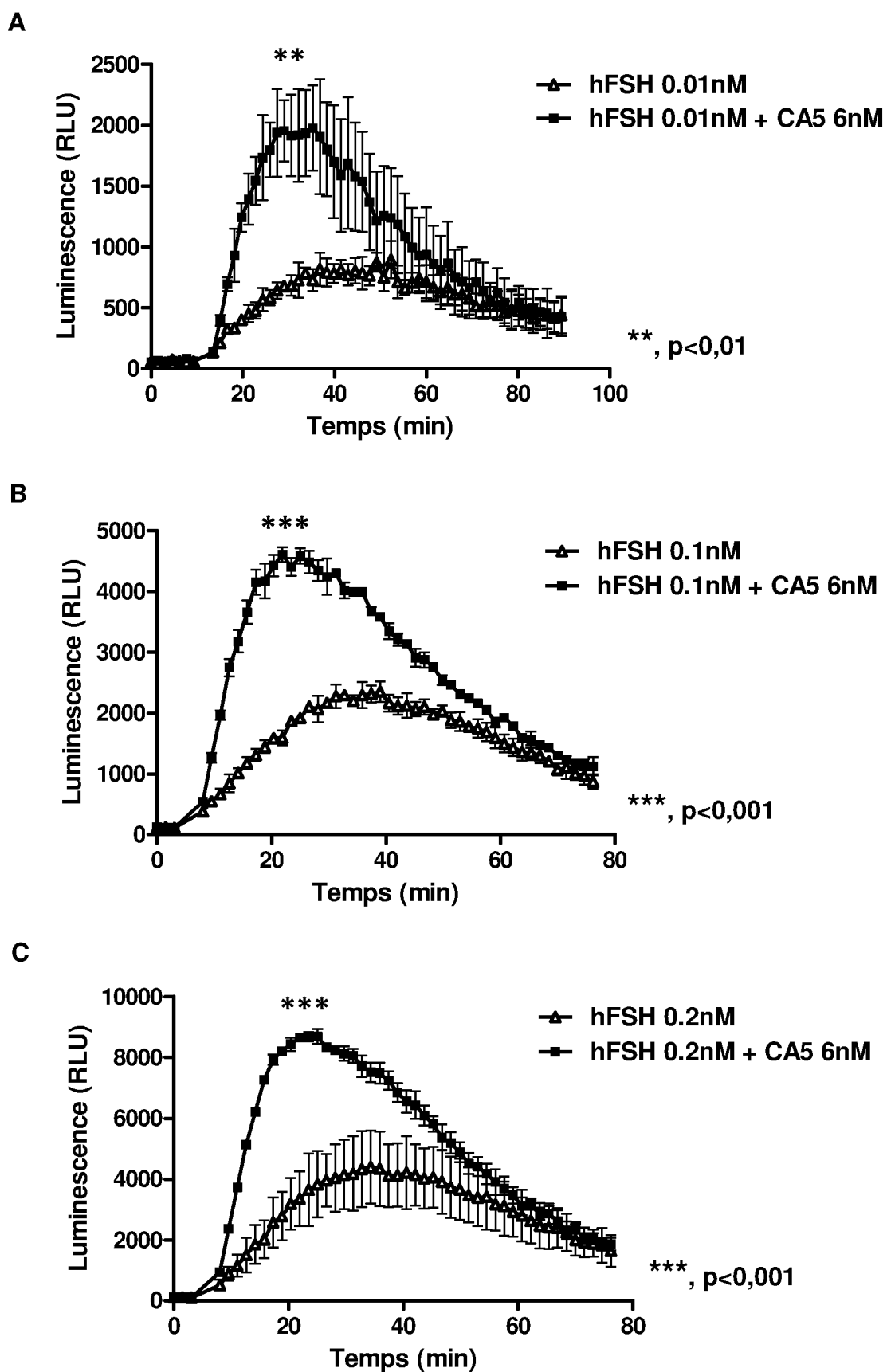
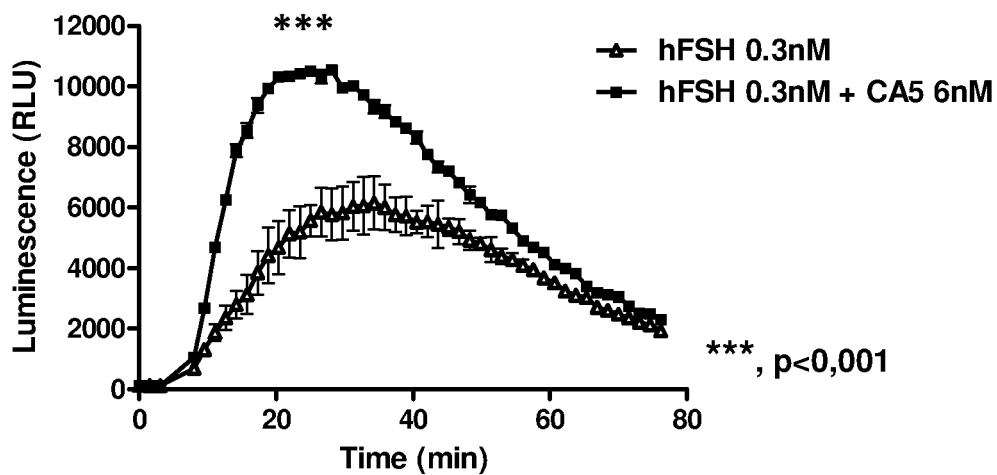


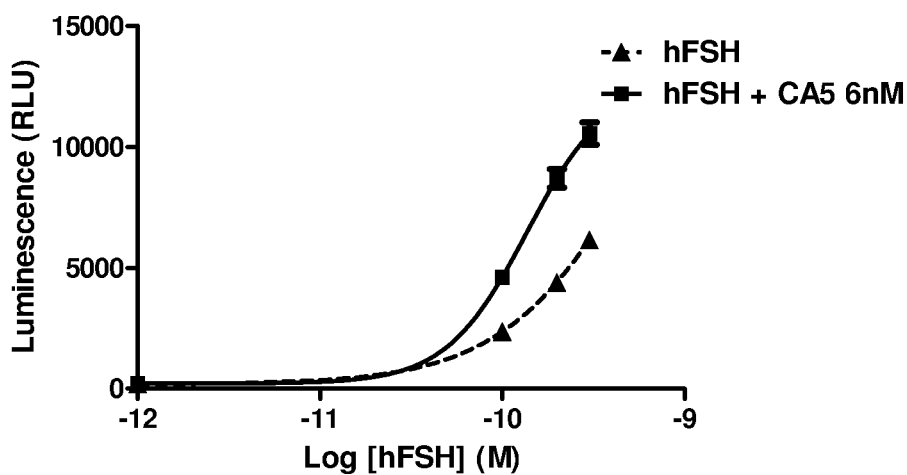
FIGURE 5

7/31

D



E



	hFSH	hFSH + CA5 6nM
LogEC50	-9.231	-9.864
HillSlope	1.152	1.965
EC50	5.869e-010	1.367e-010

F

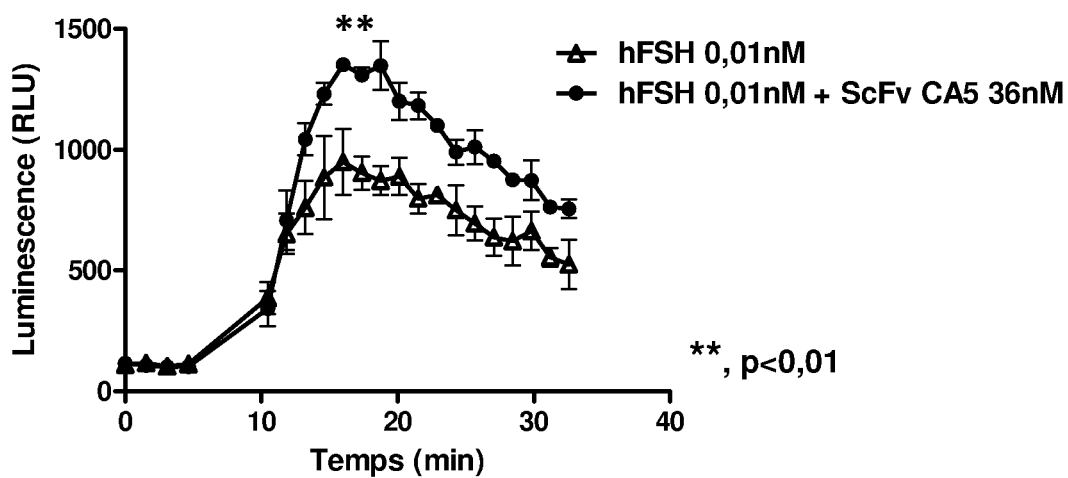


Figure 5 (fin)

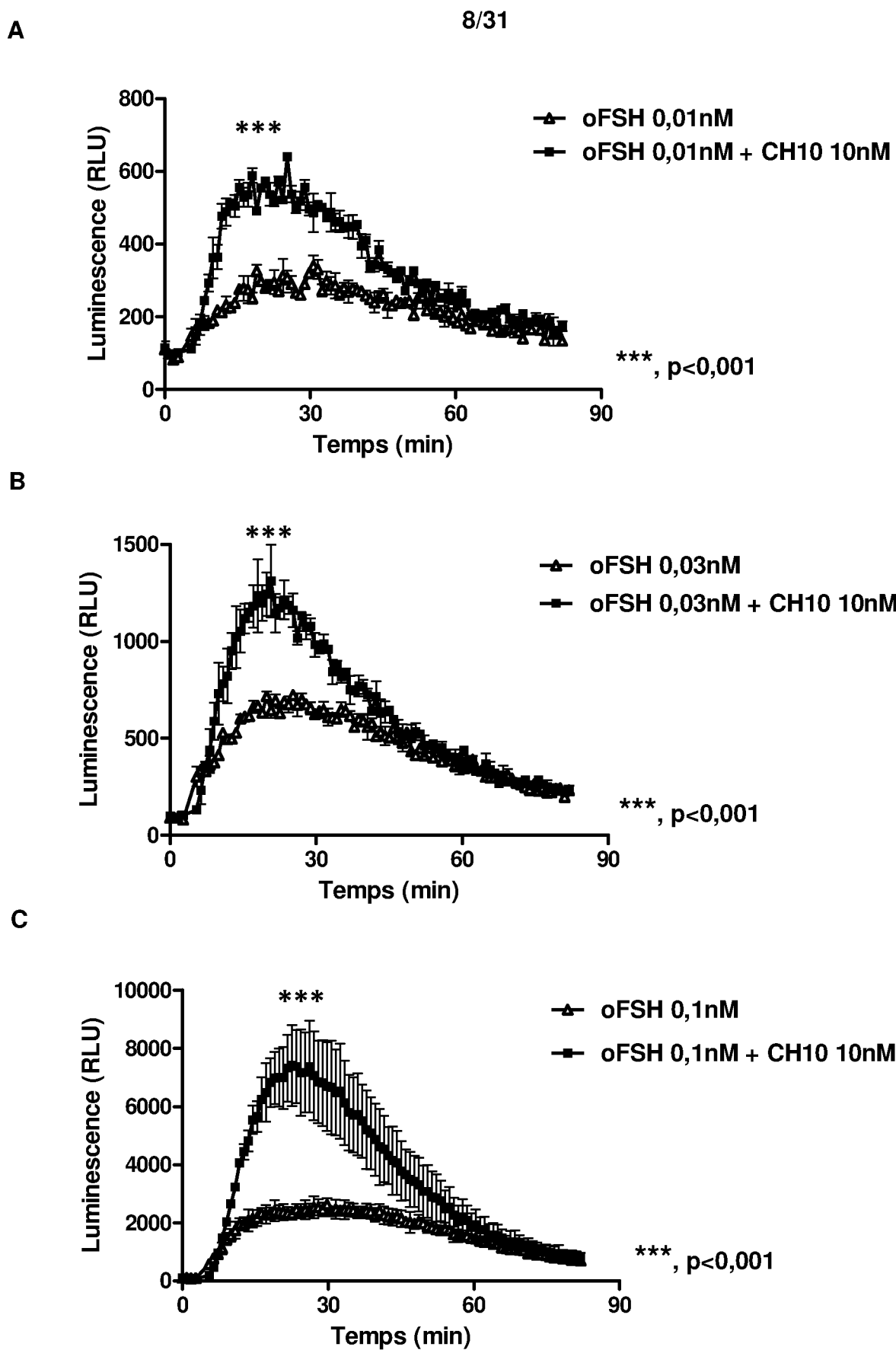


FIGURE 6

9/31

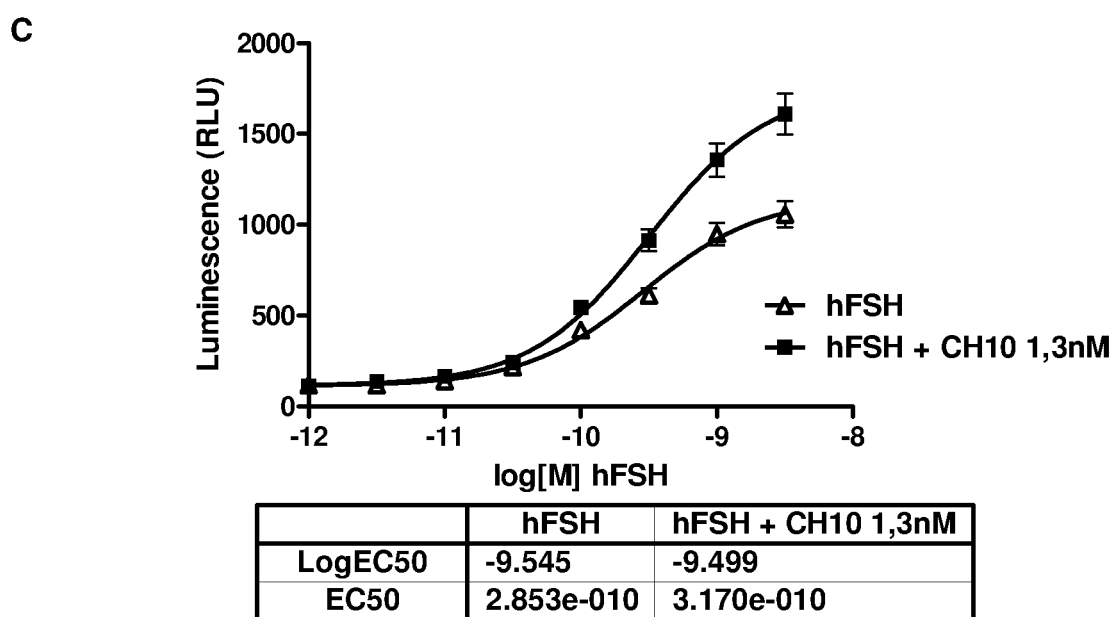
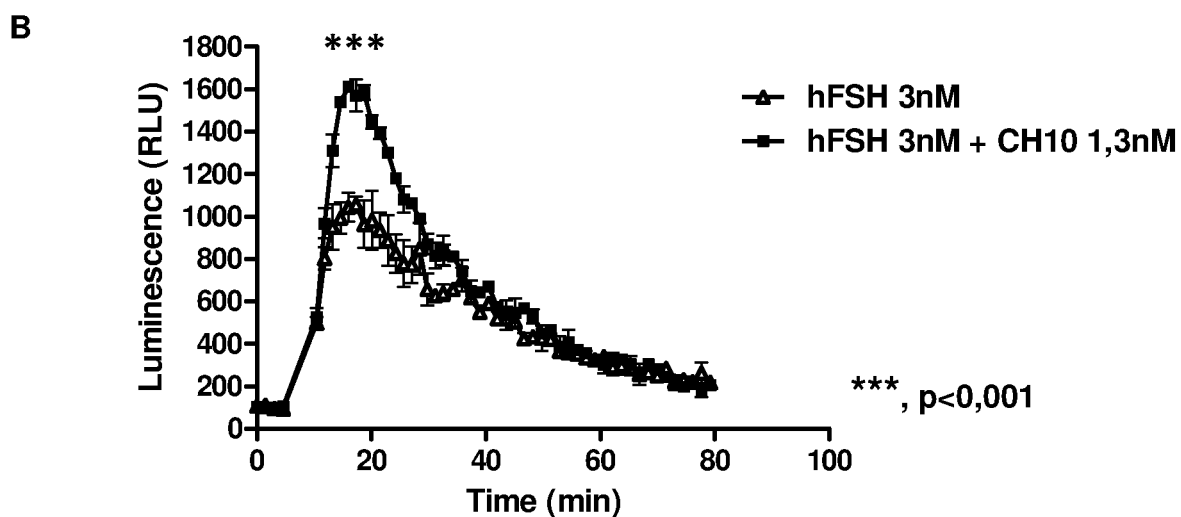
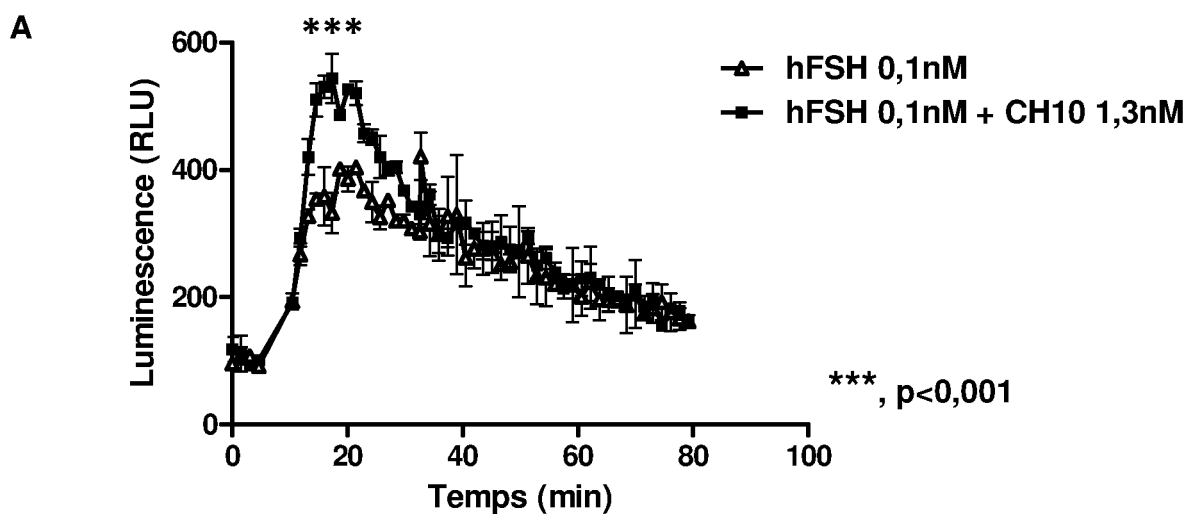


FIGURE 7

10/31

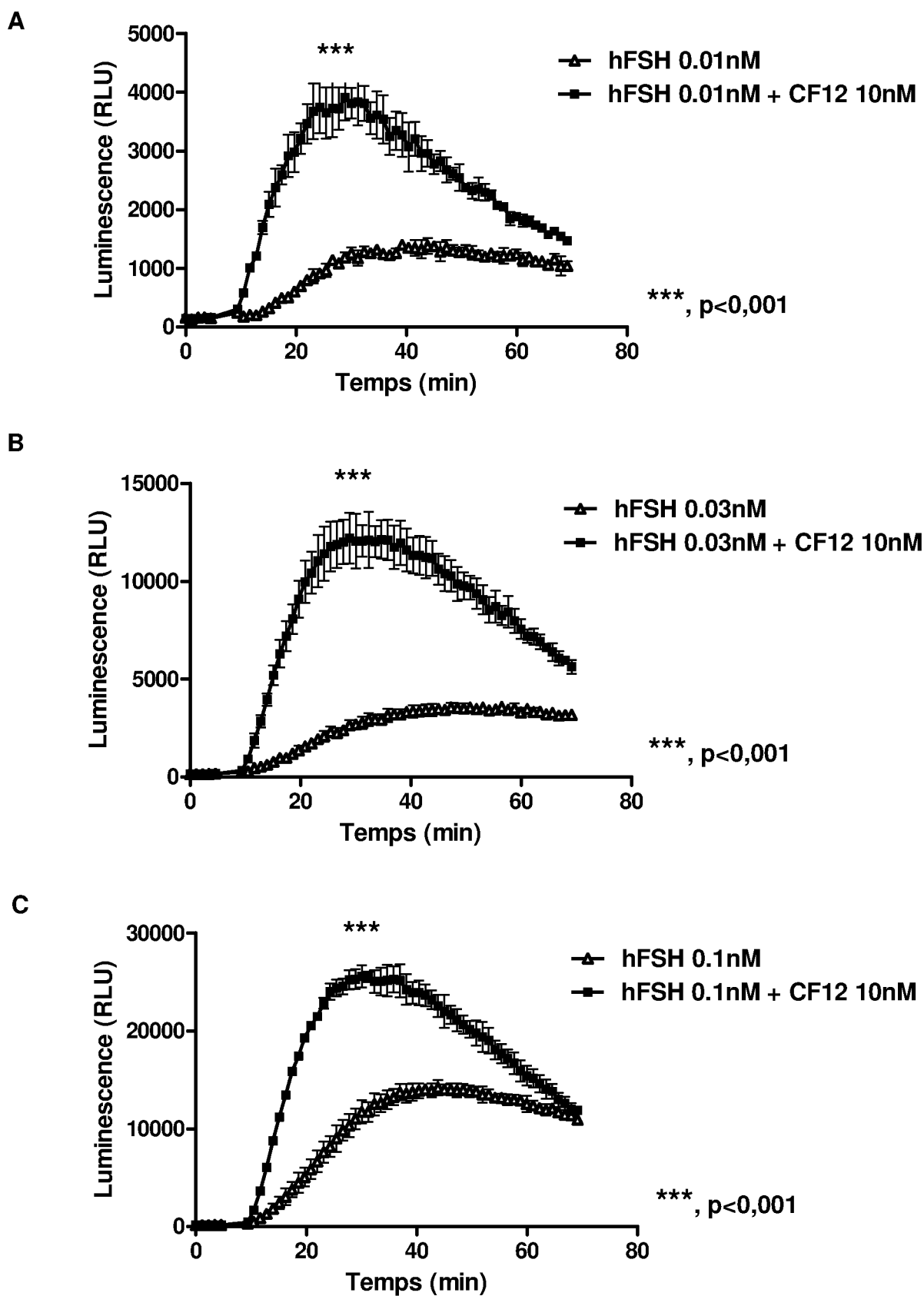
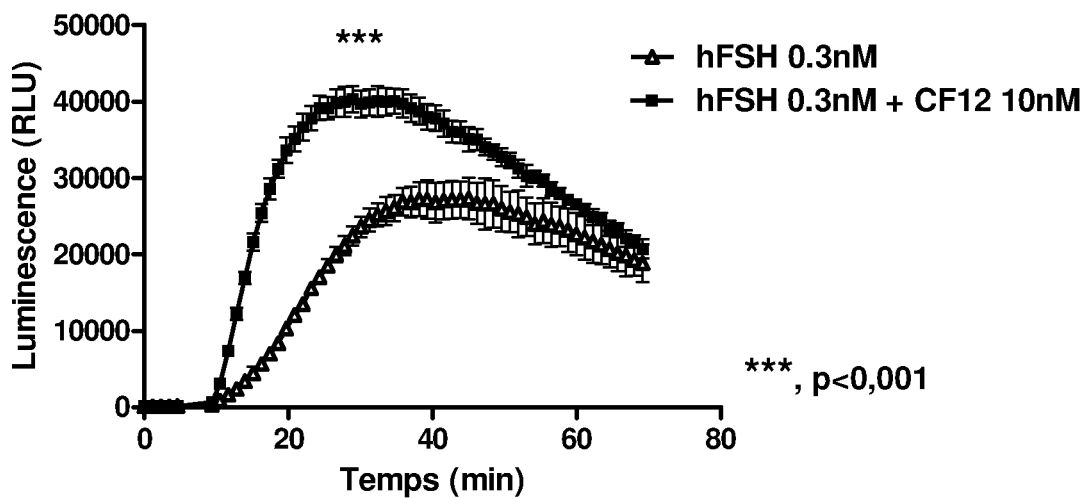


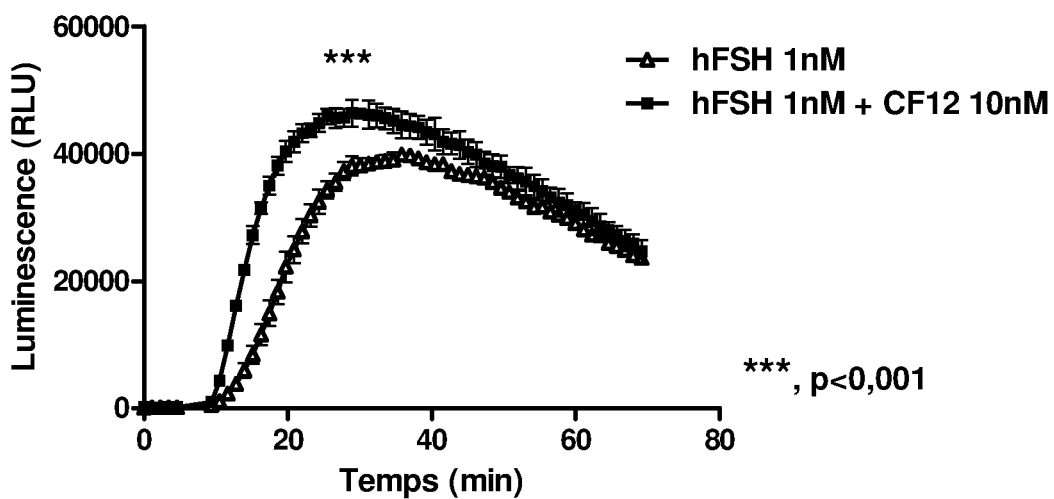
FIGURE 8

11/31

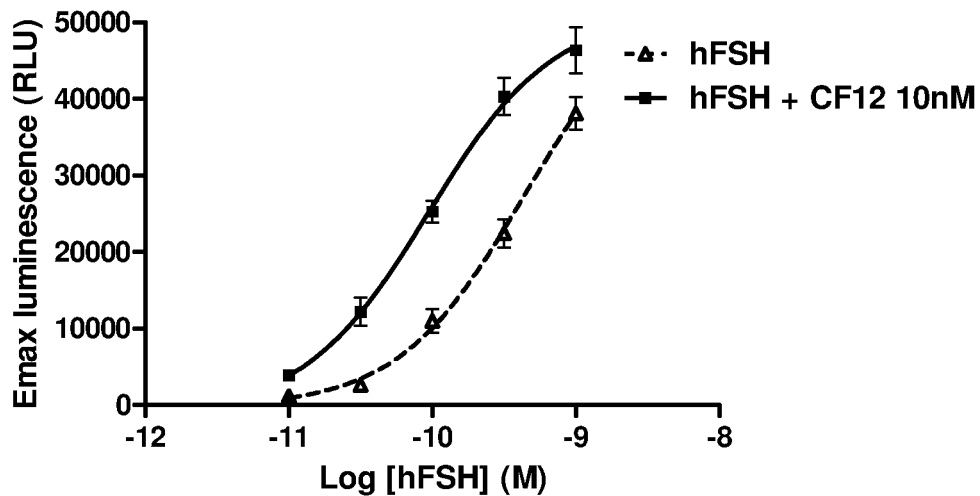
D



E



F



	hFSH	hFSH + CF12 10nM
LogEC50	-9.371	-10.03
EC50	4.256e-010	9.388e-011

FIGURE 8 (fin)

12/31

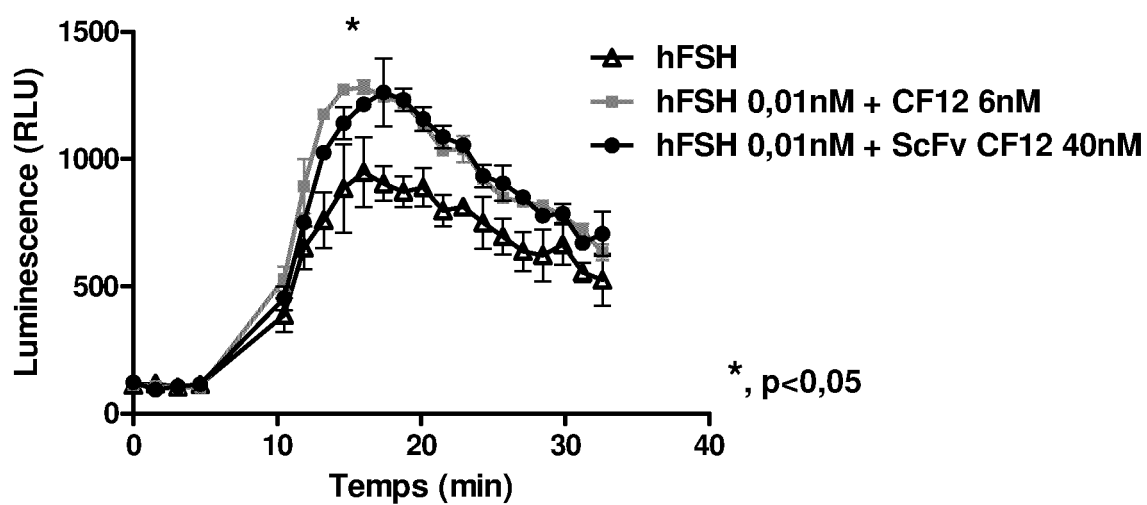


Figure 9

13/31

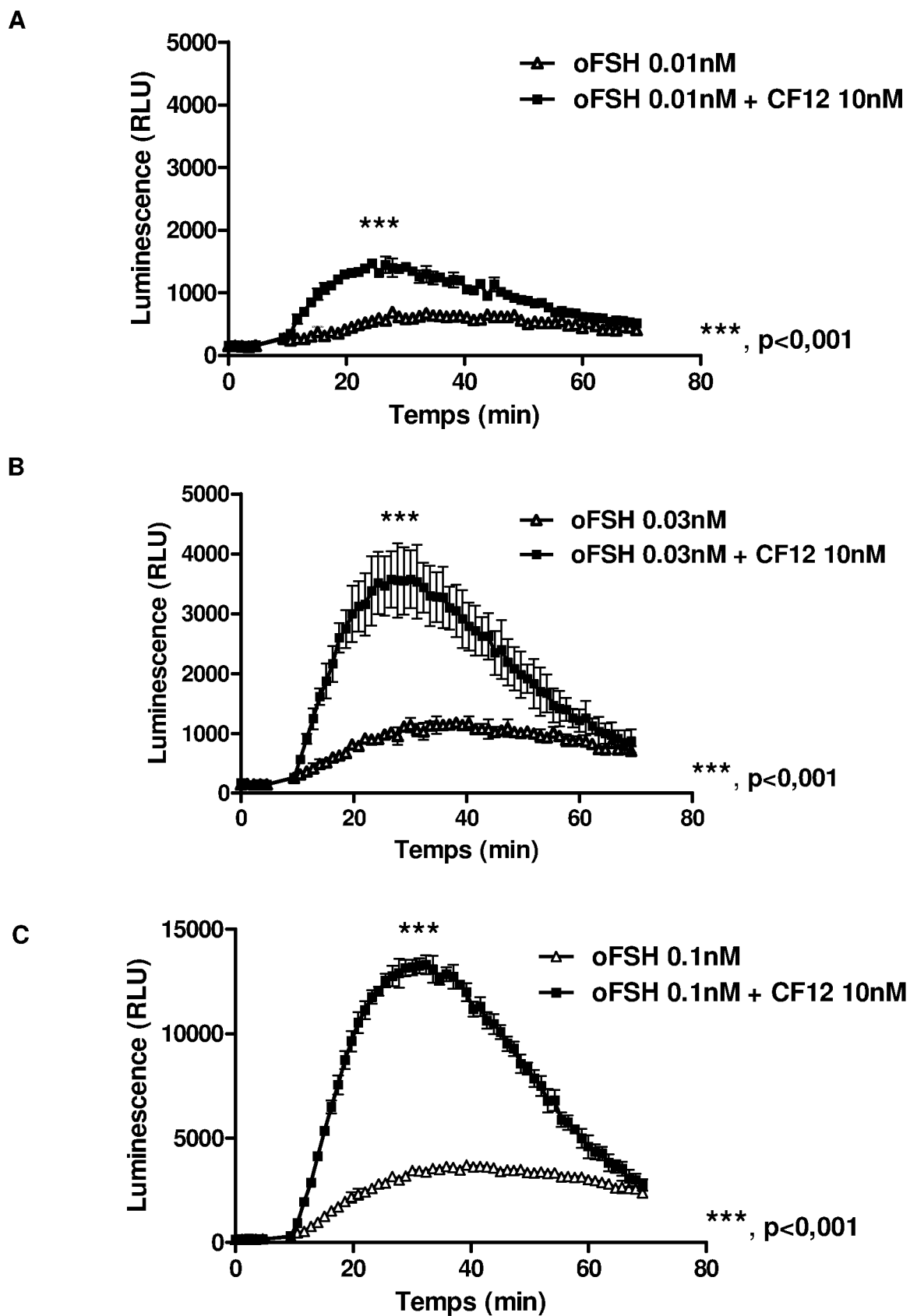
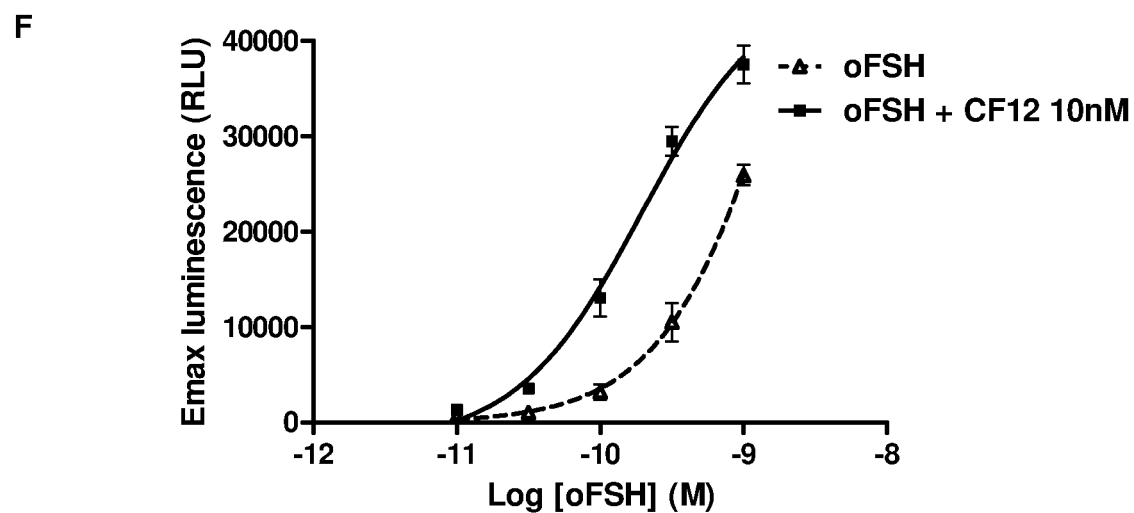
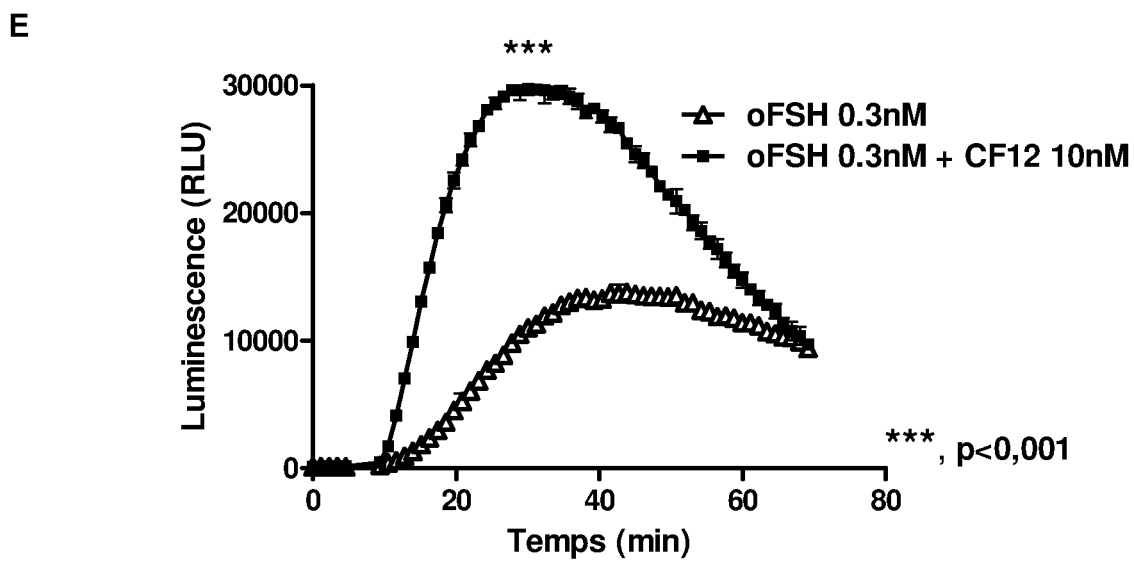
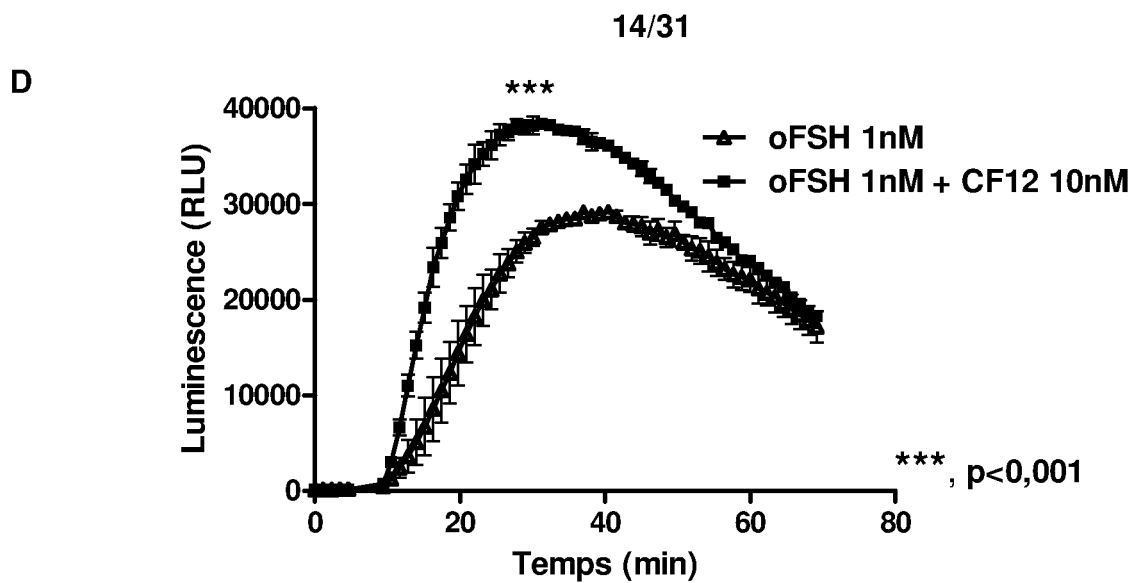


FIGURE 10



	oFSH	oFSH + CF12 10nM
LogEC50	-8.640	-9.707
EC50	2.291e-009	1.964e-010

FIGURE 10 (fin)

15/31

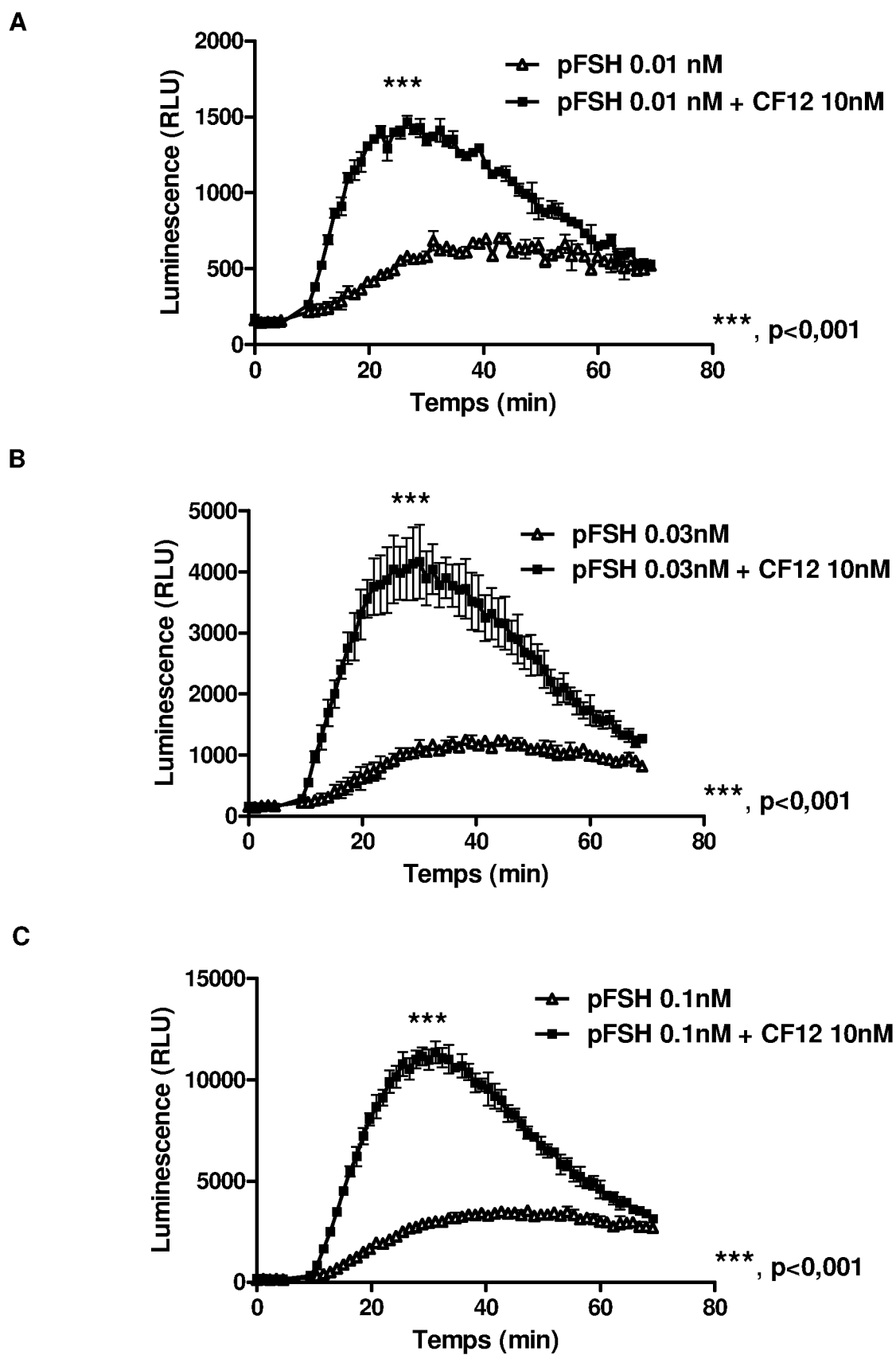
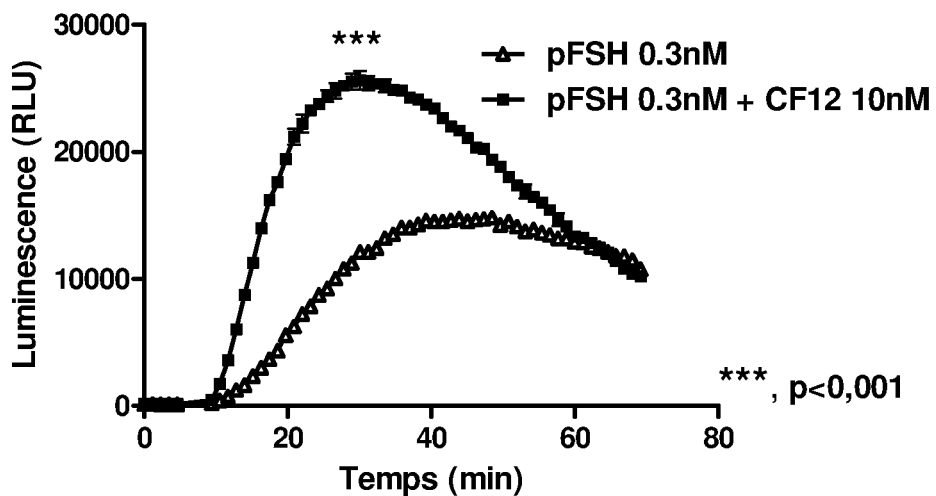


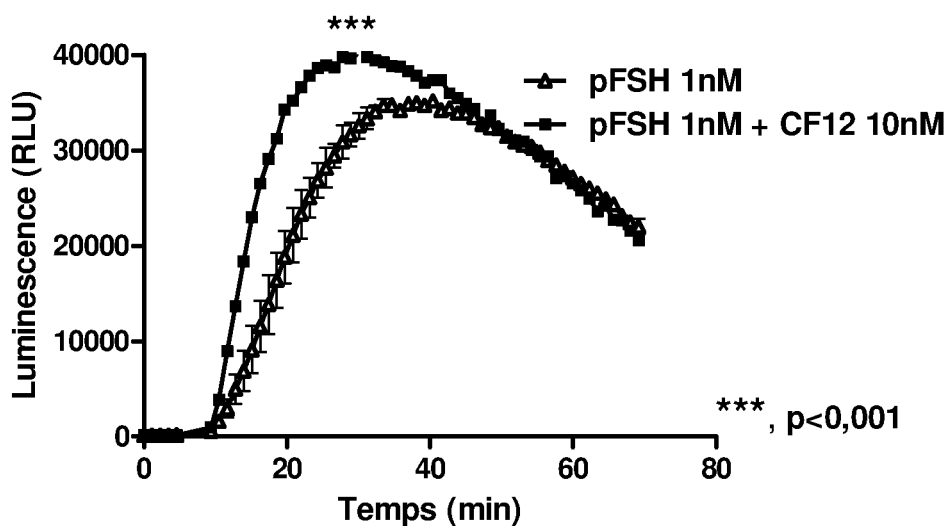
FIGURE 11

D

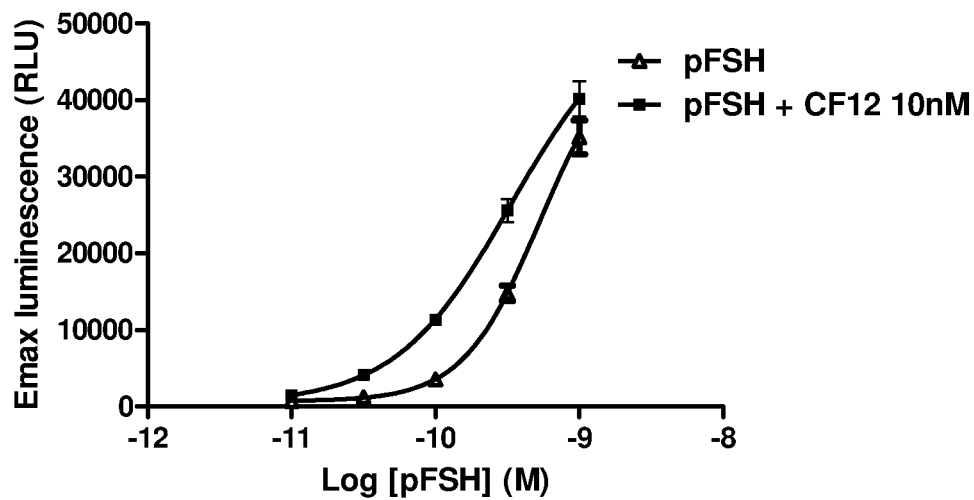
16/31



E



F



	pFSH	pFSH+CF12 10nM
LogEC50	-8.715	-9.432
EC50	1.926e-009	3.699e-010

FIGURE 11 (fin)

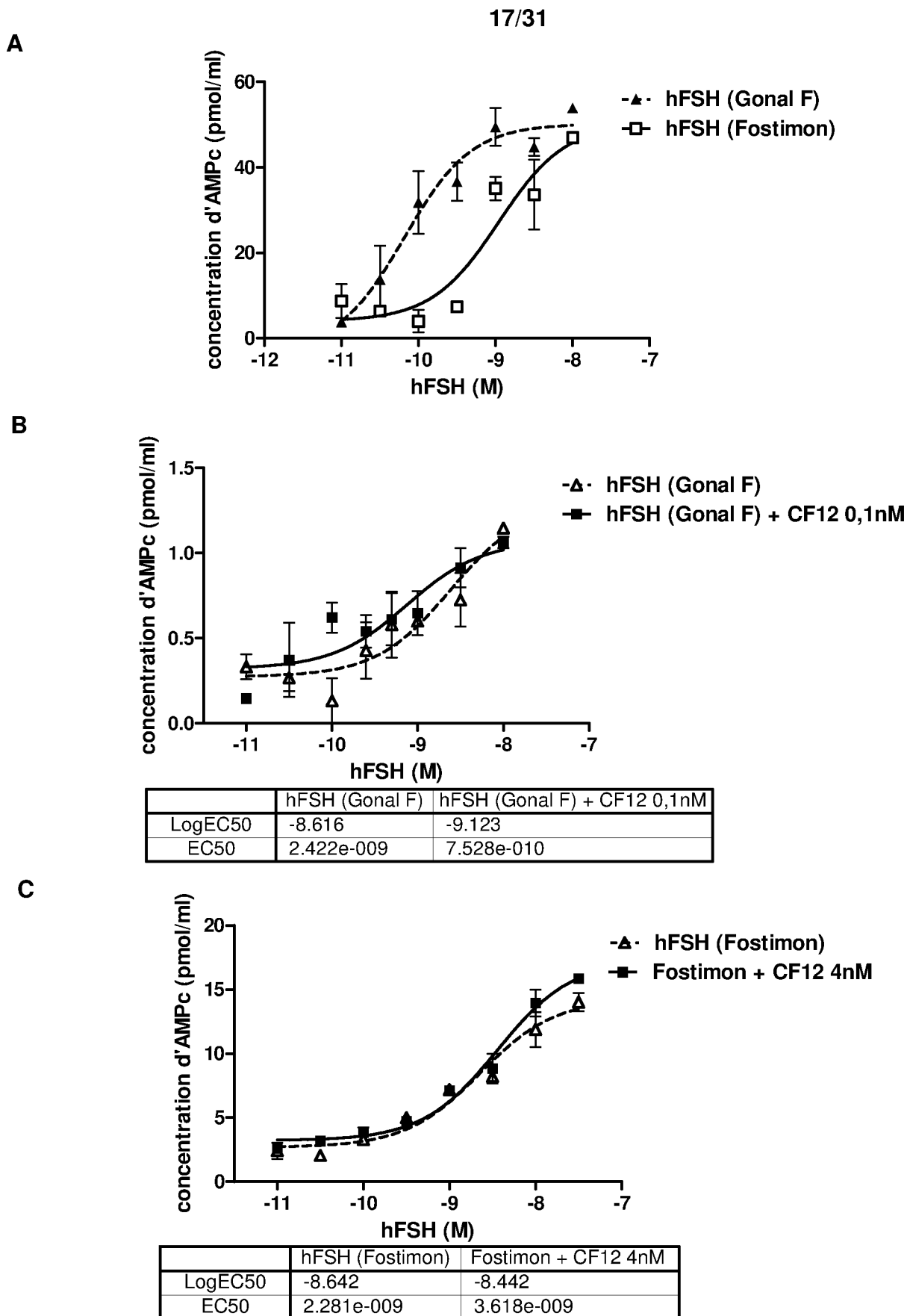


Figure 12

18/31

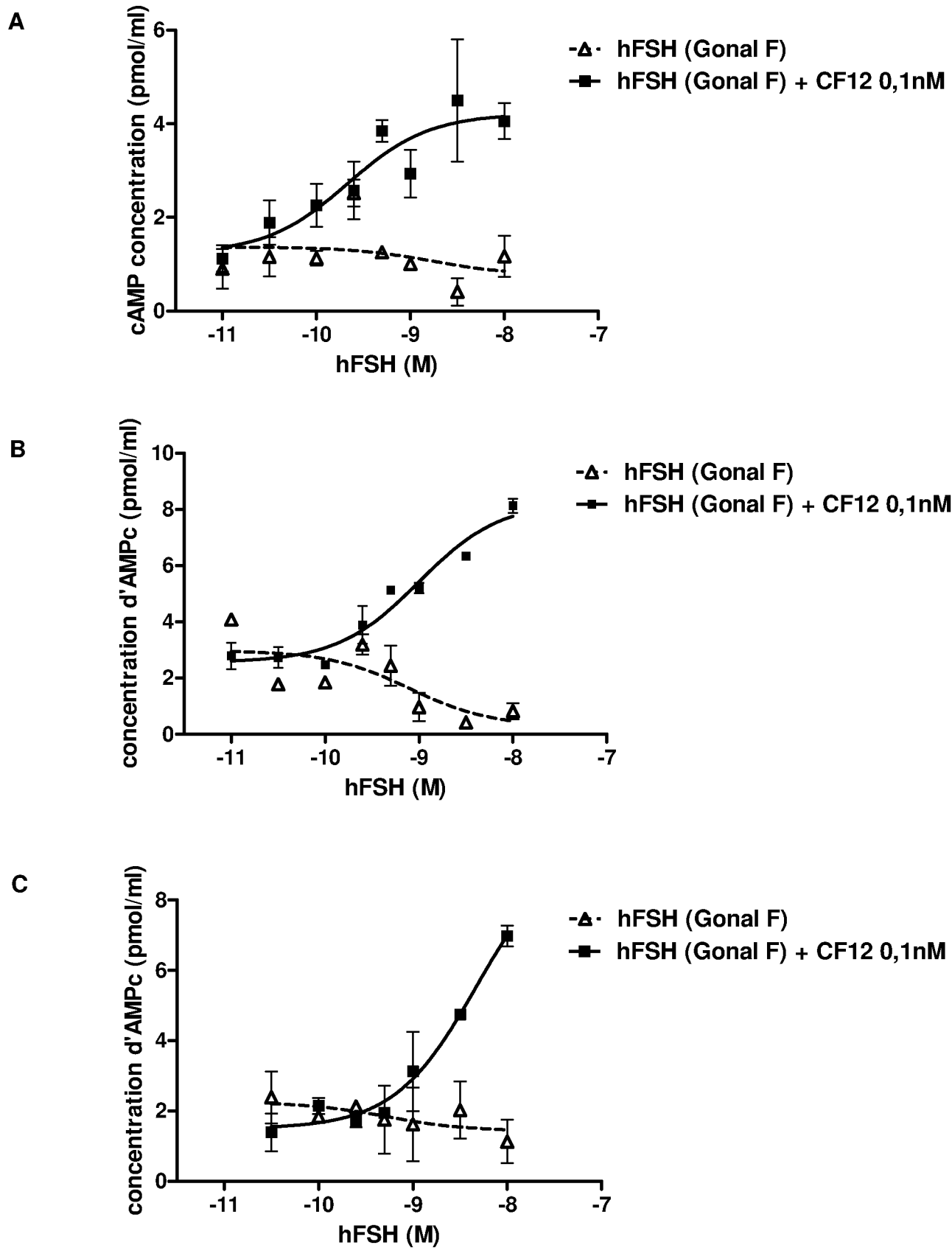
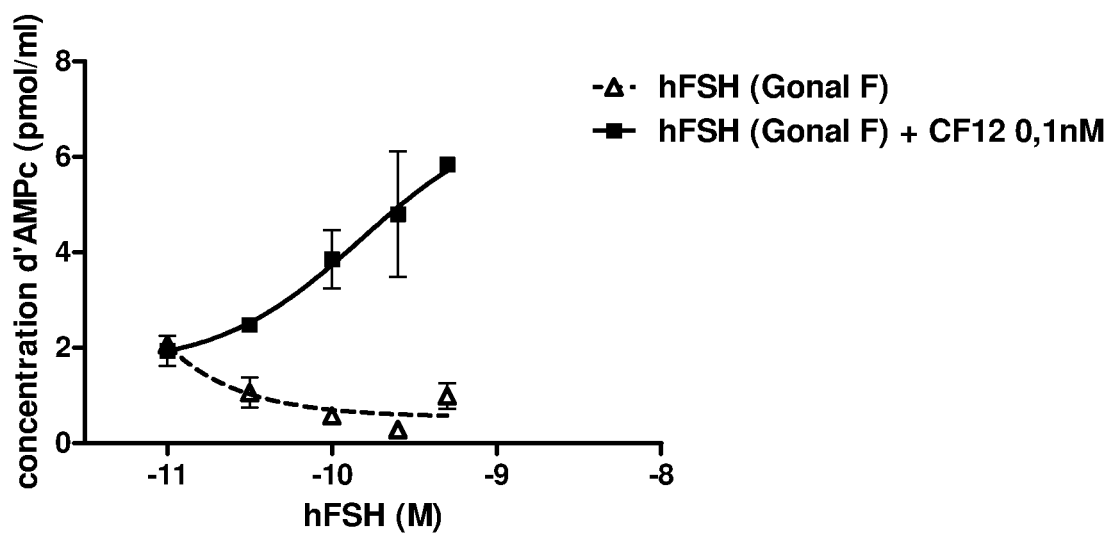


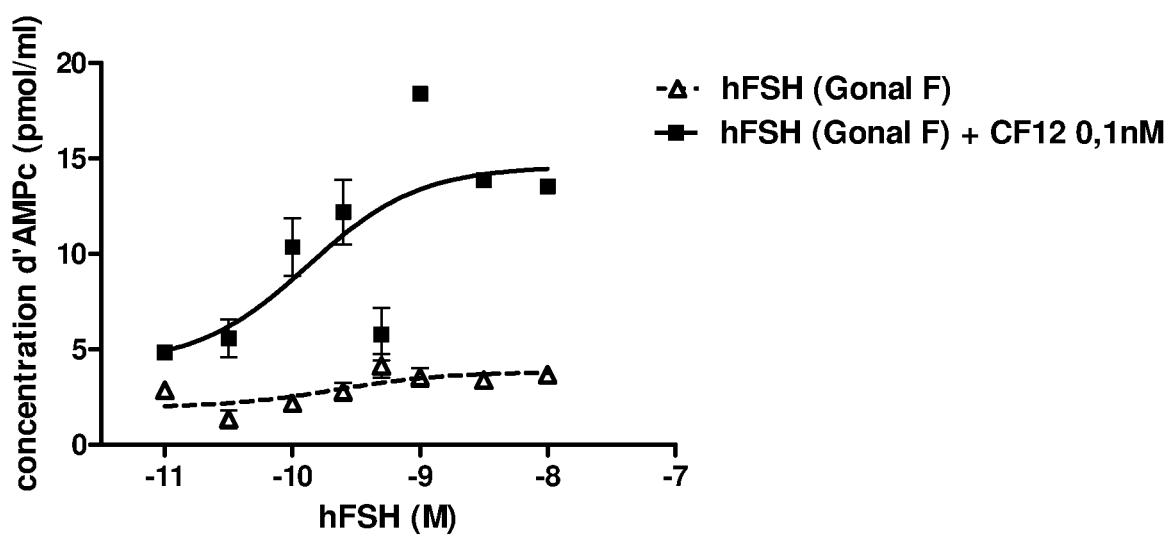
Figure 13

19/31

D



E



F

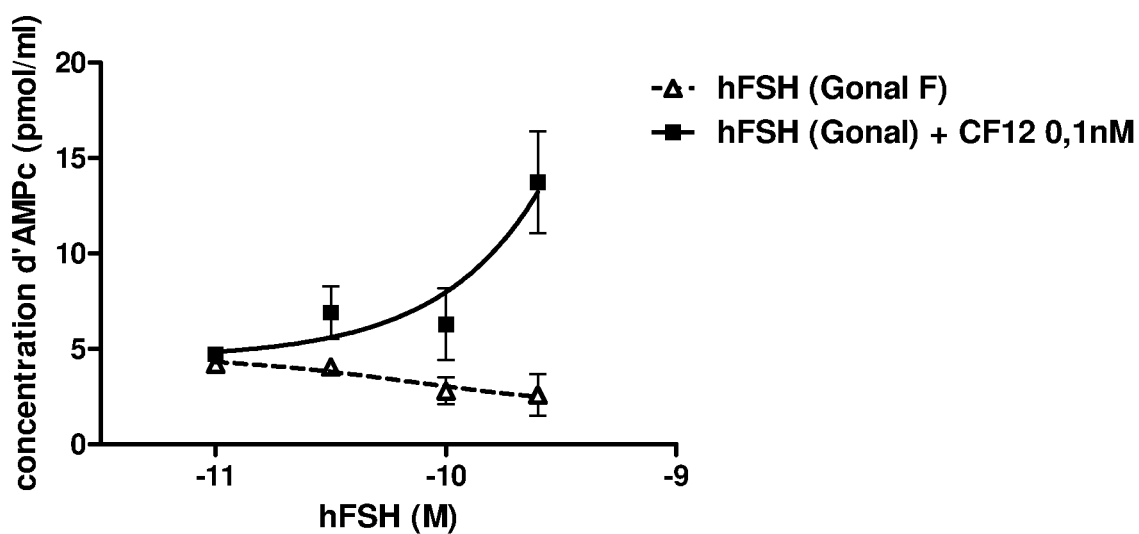


Figure 13 (fin)

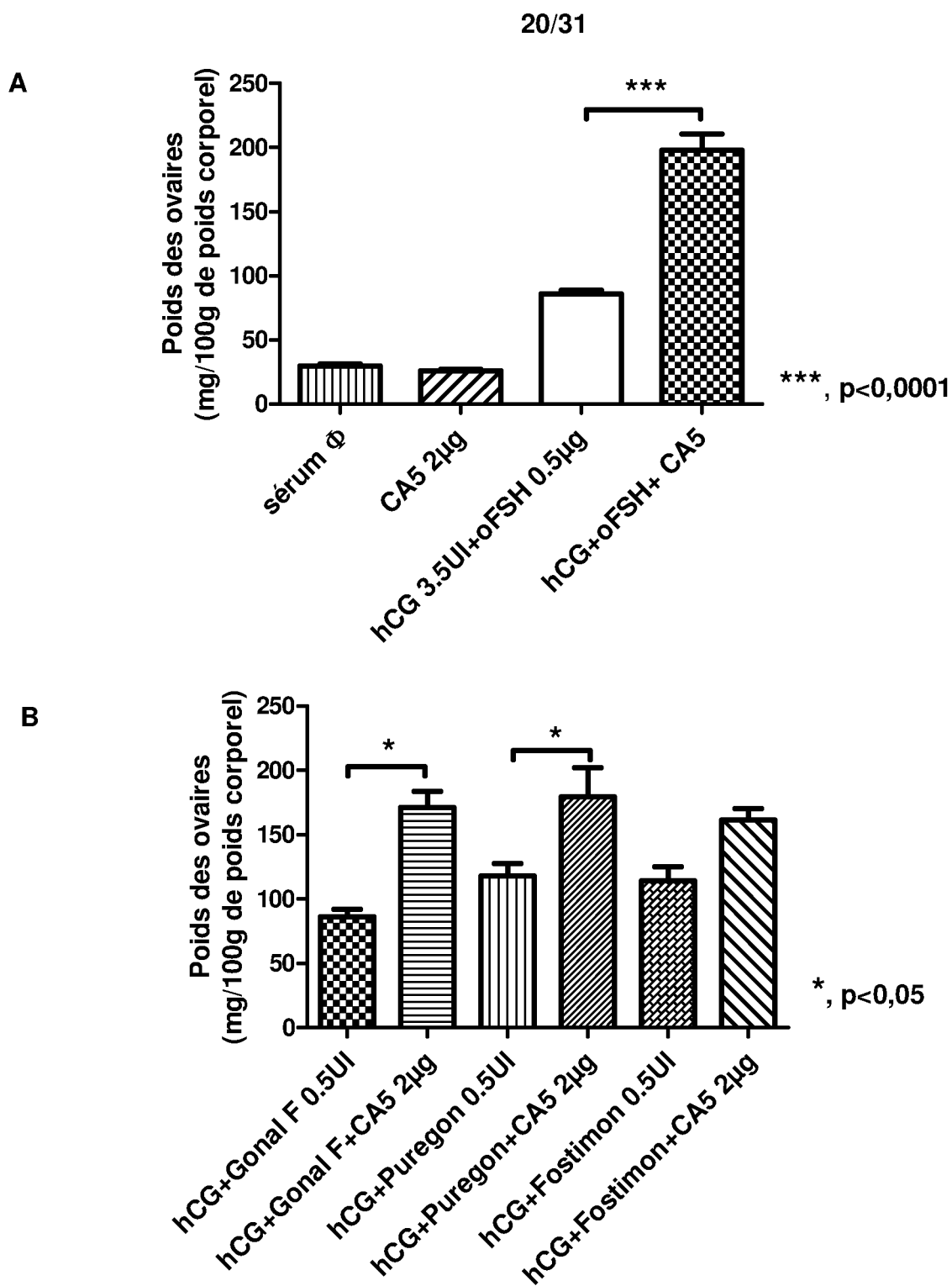
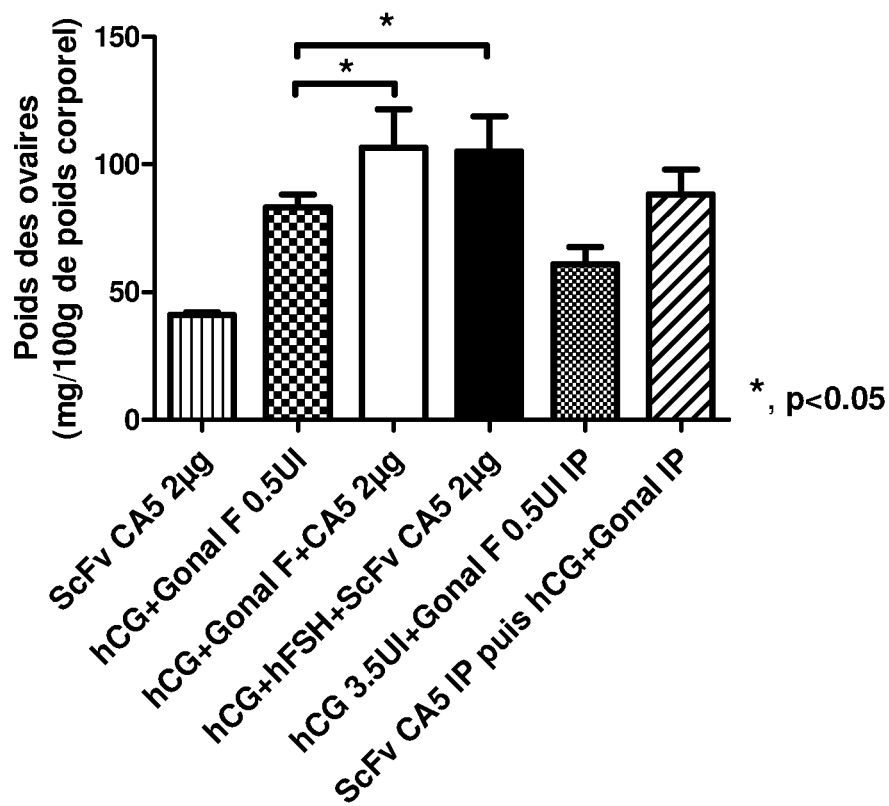


FIGURE 14

21/31

A



B

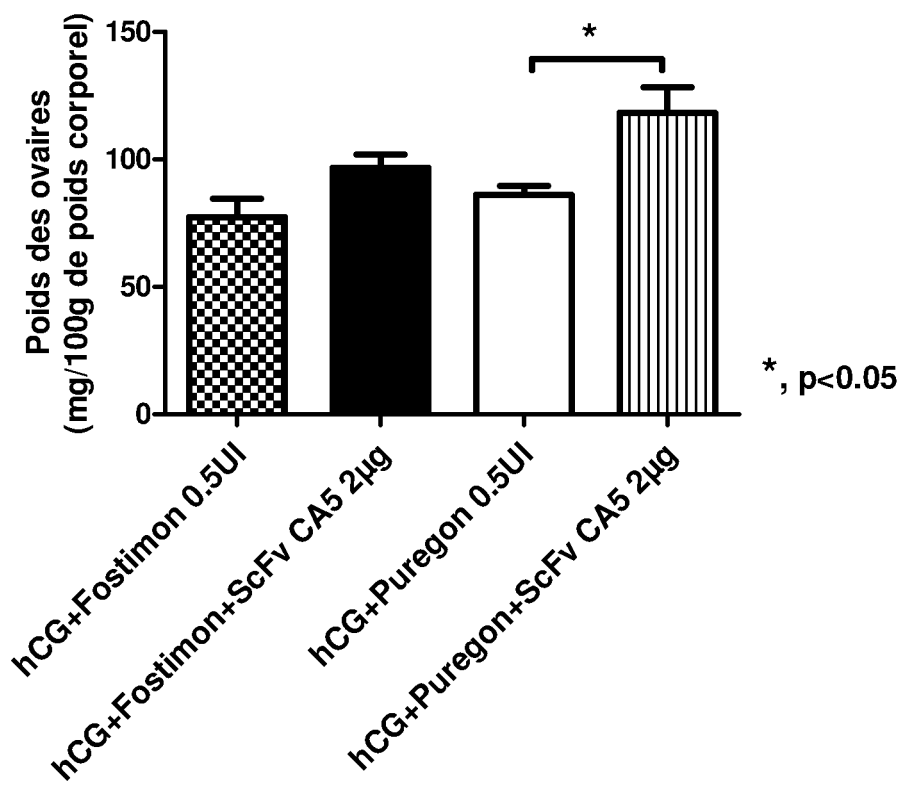


FIGURE 15

22/31

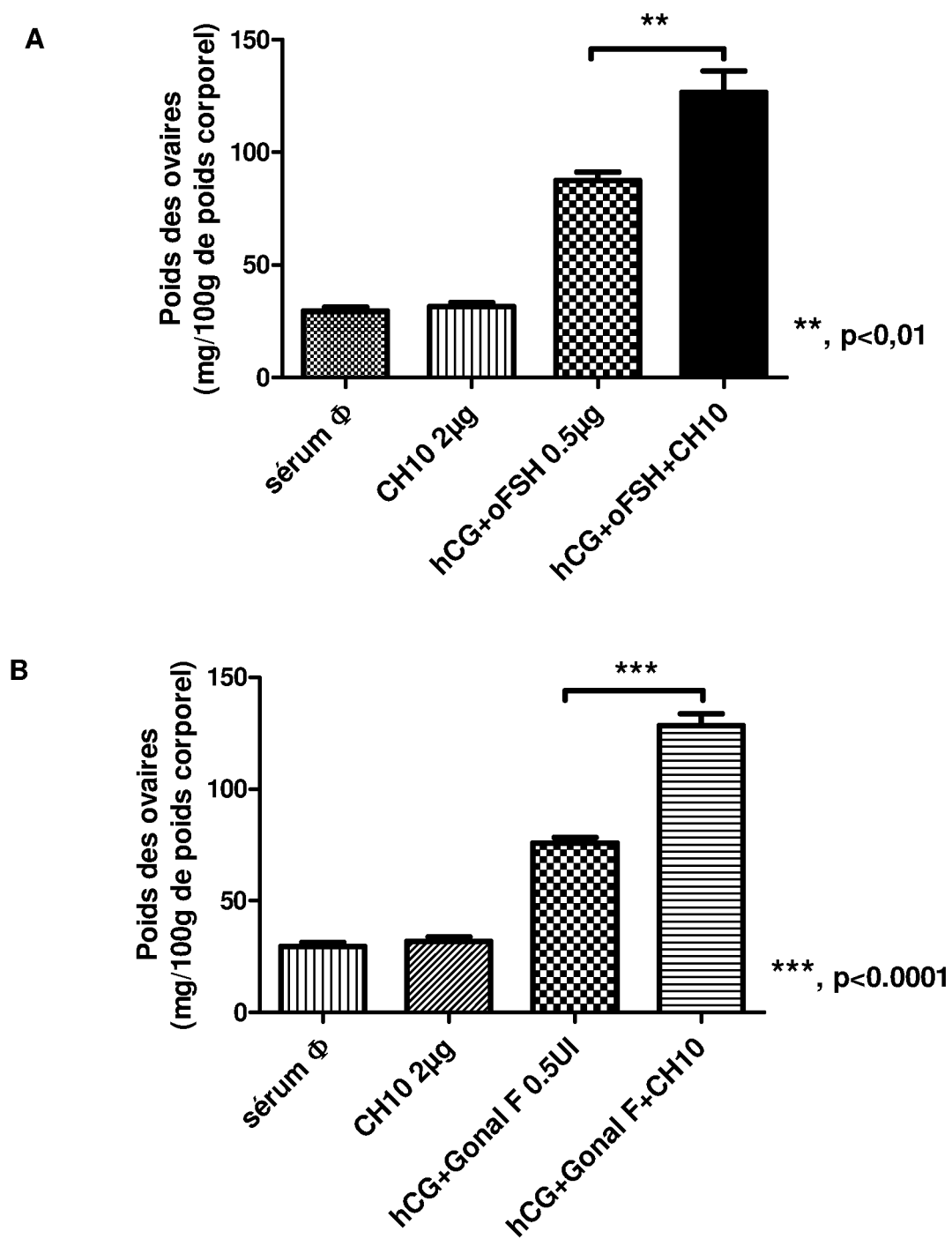


FIGURE 16

23/31

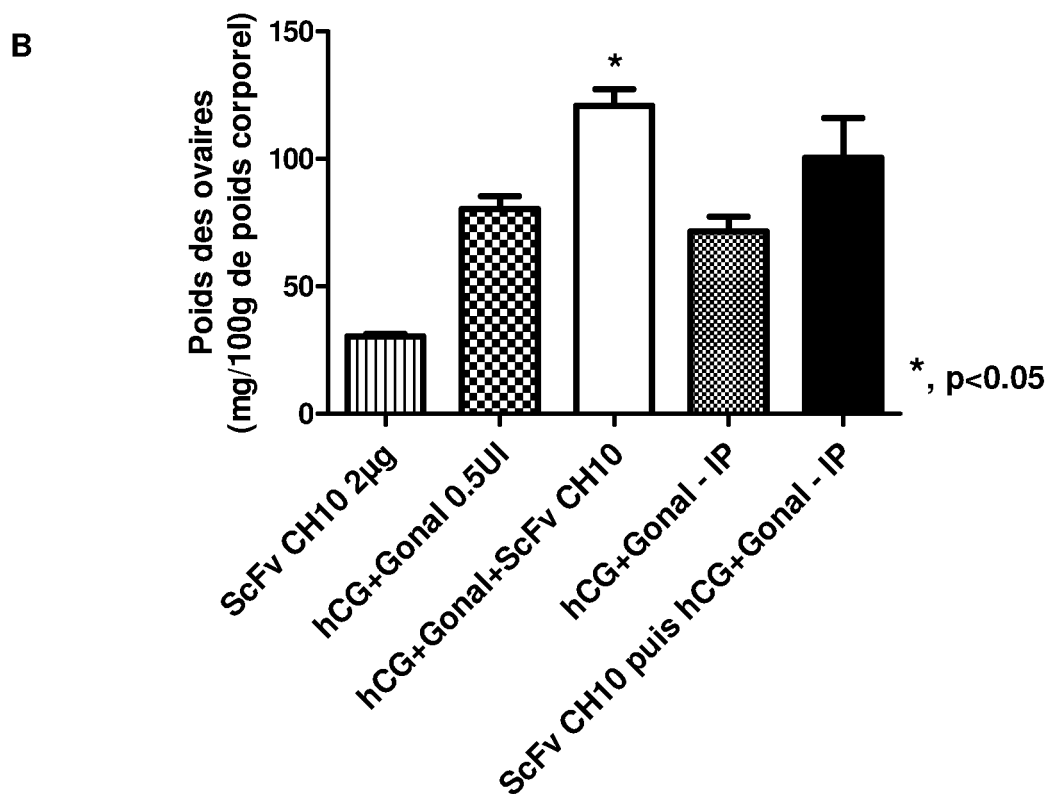
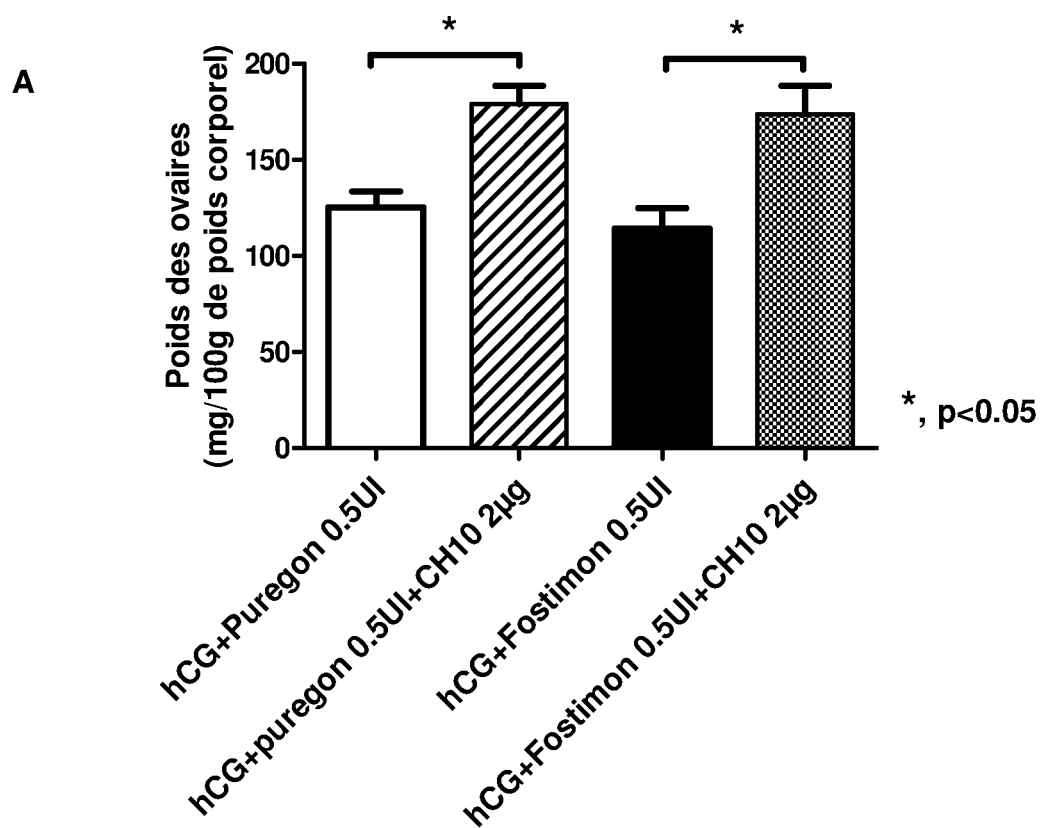
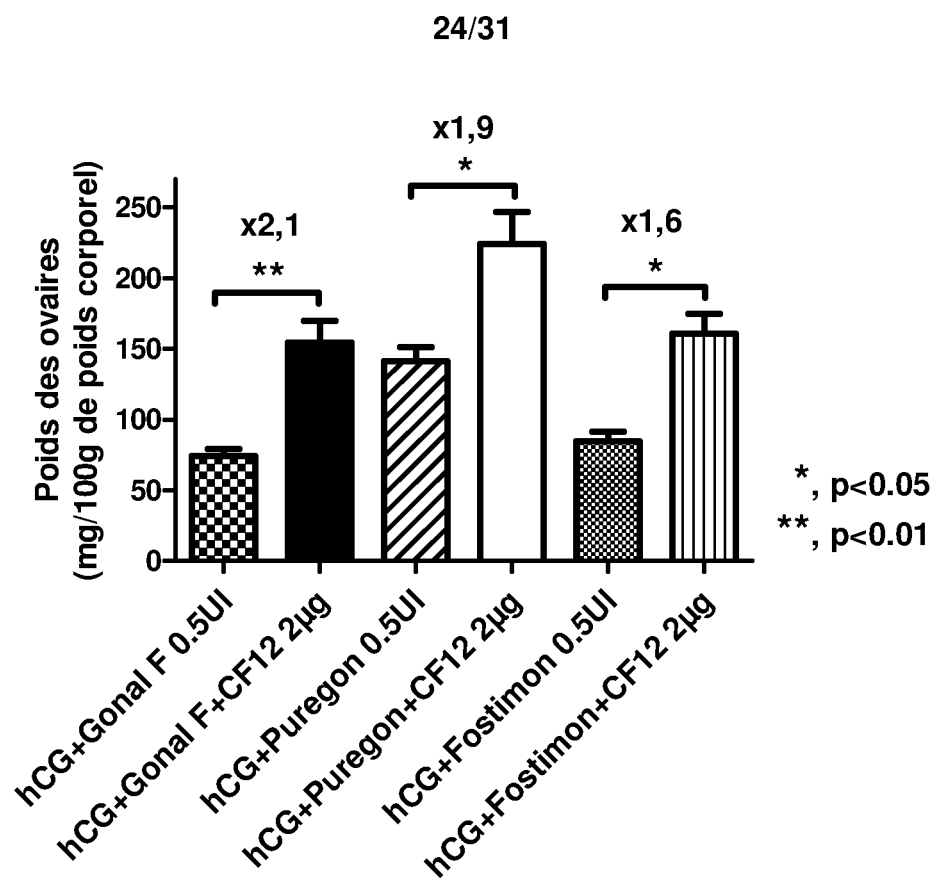


FIGURE 17

A



B

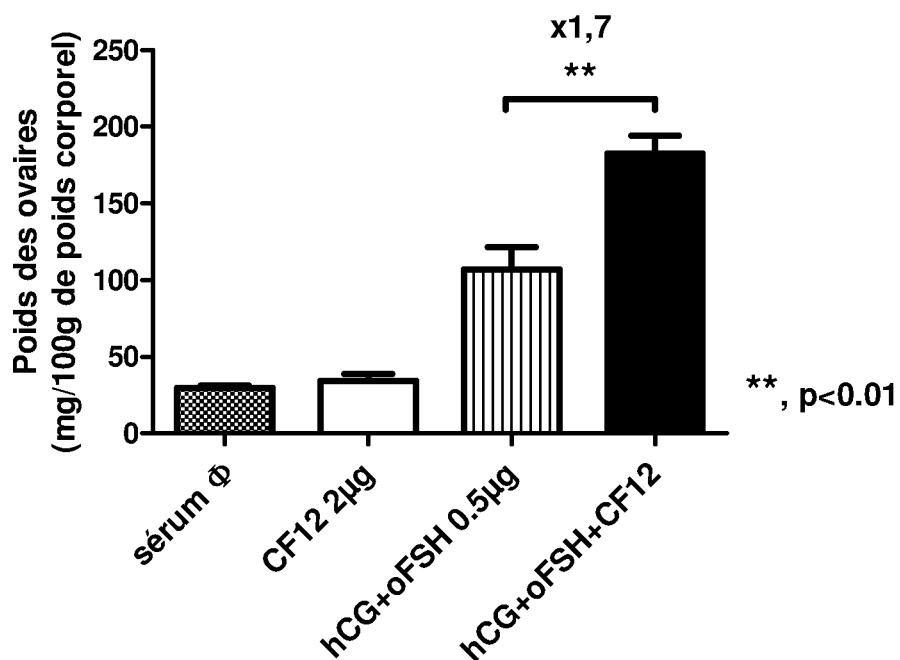


FIGURE 18

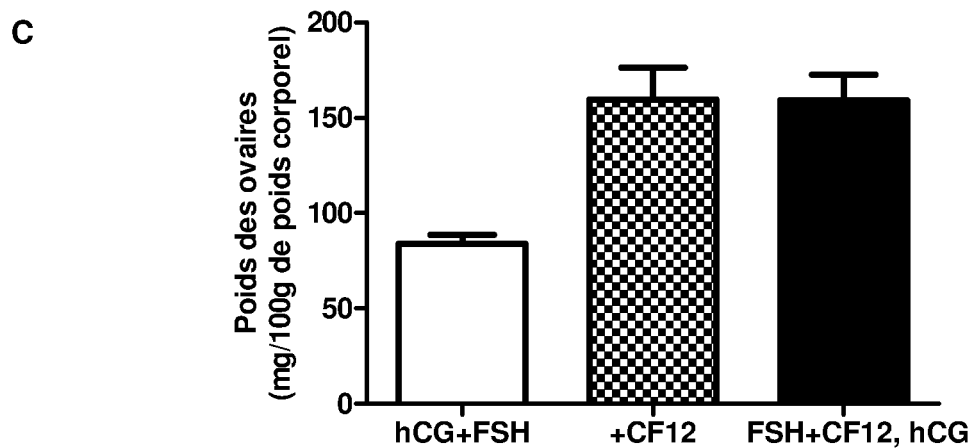
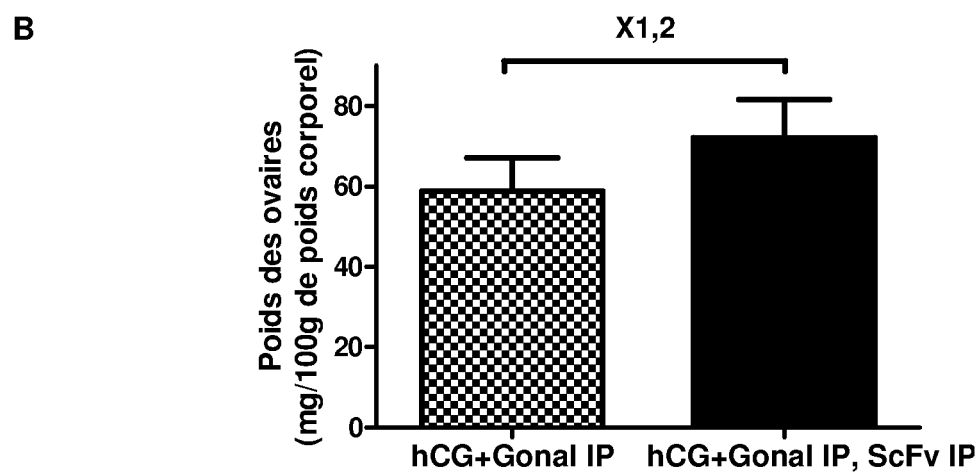
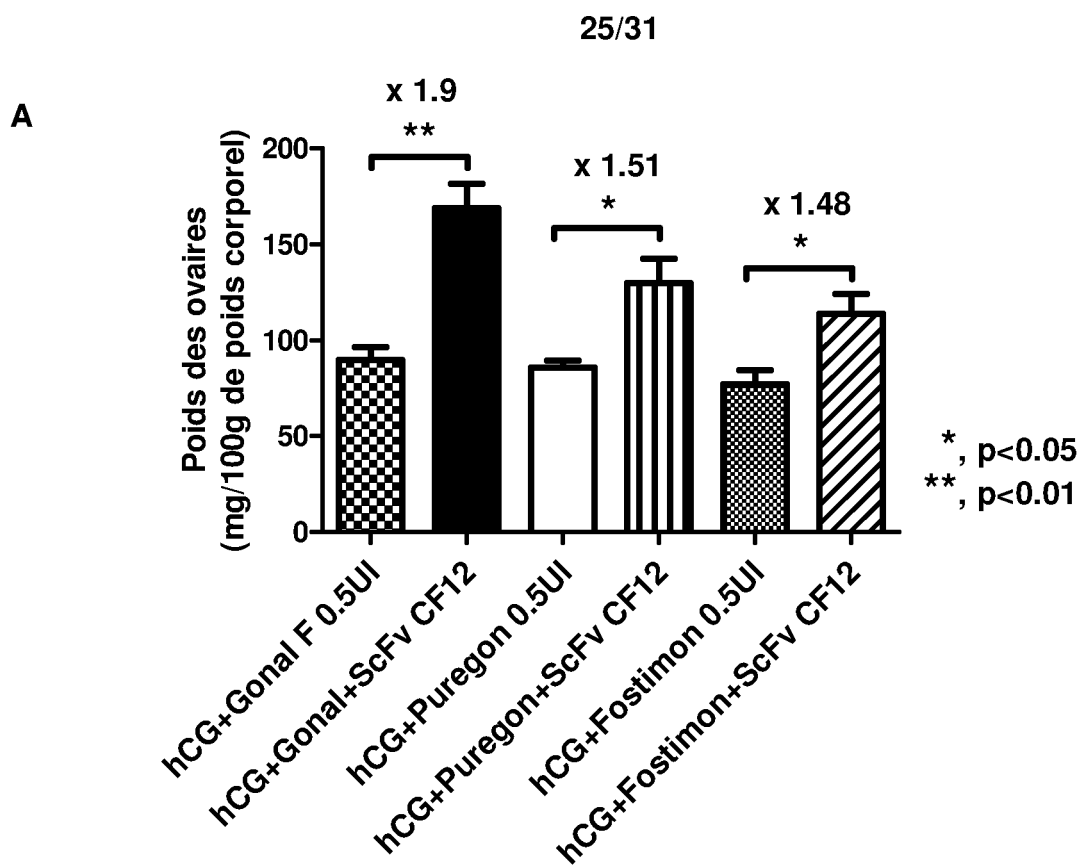


FIGURE 19

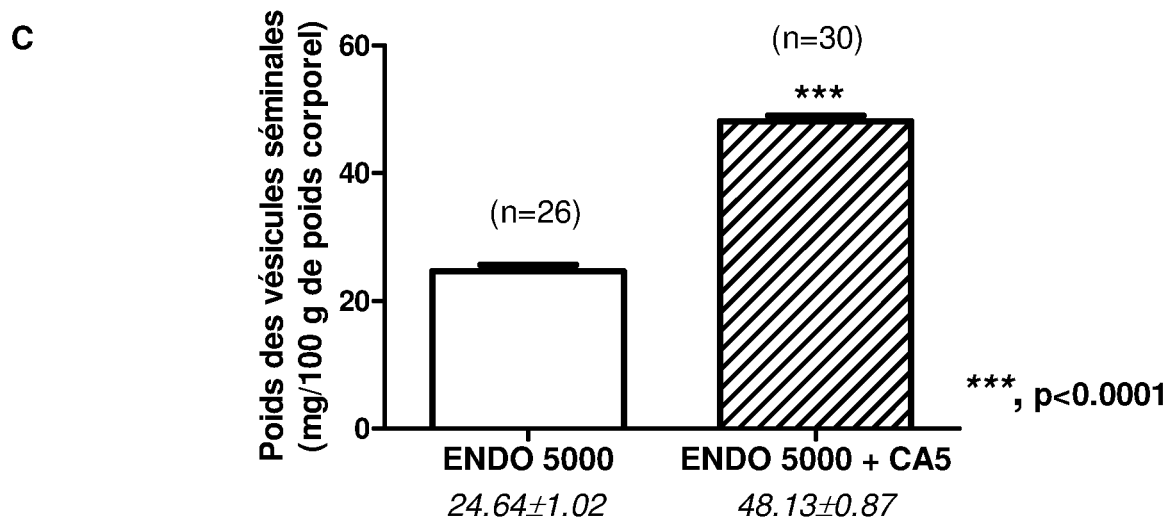
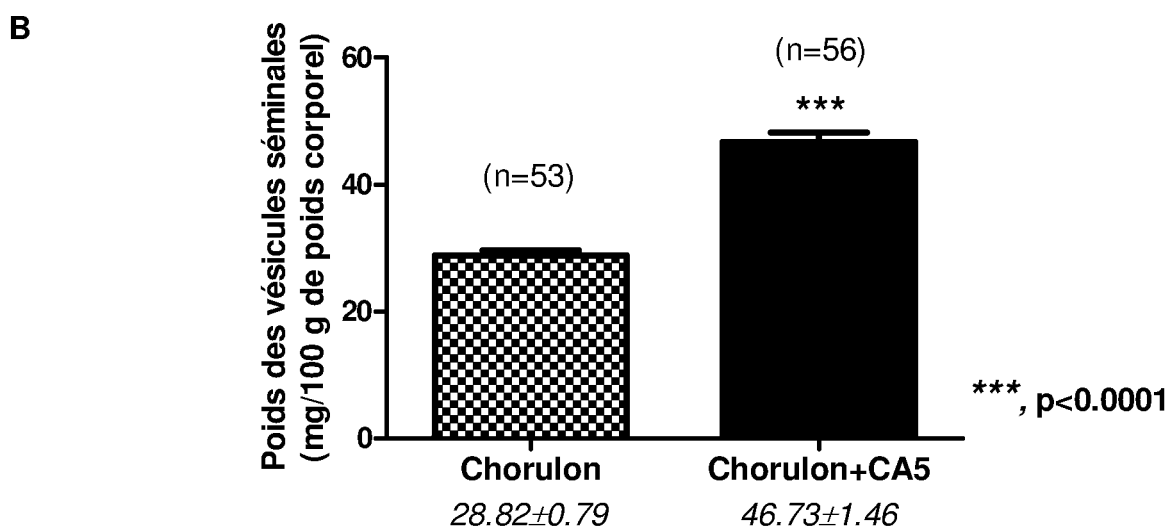
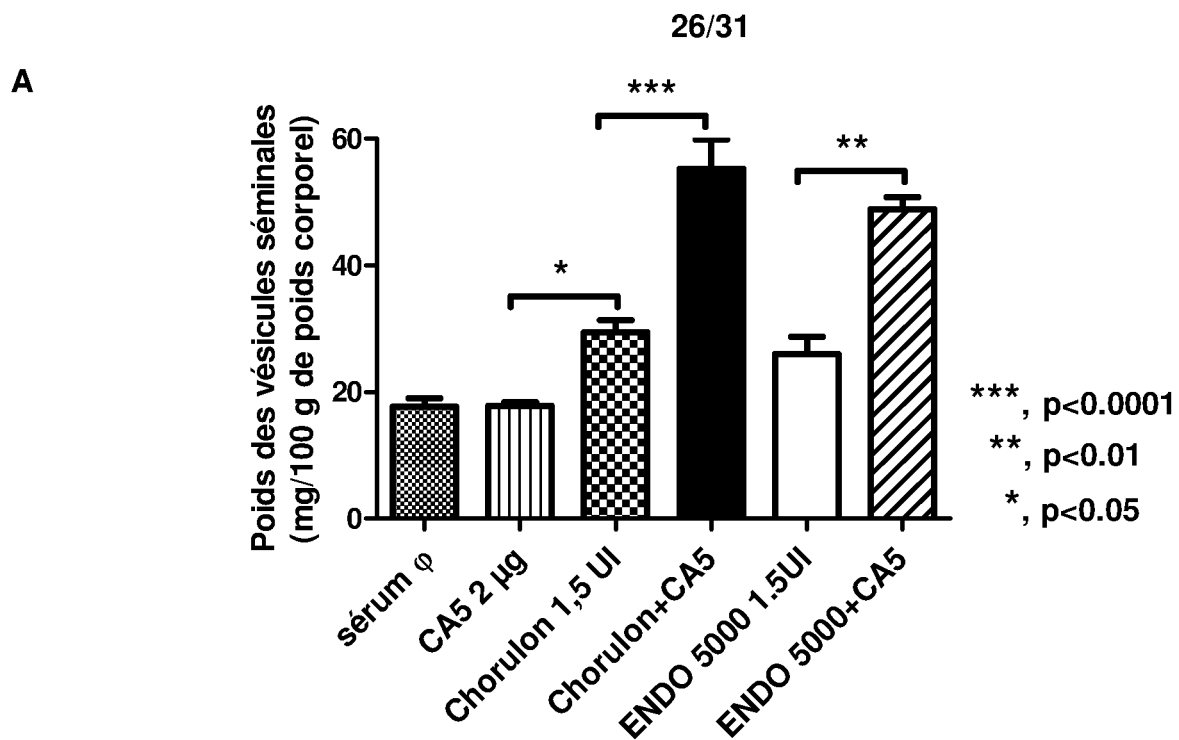


FIGURE 20

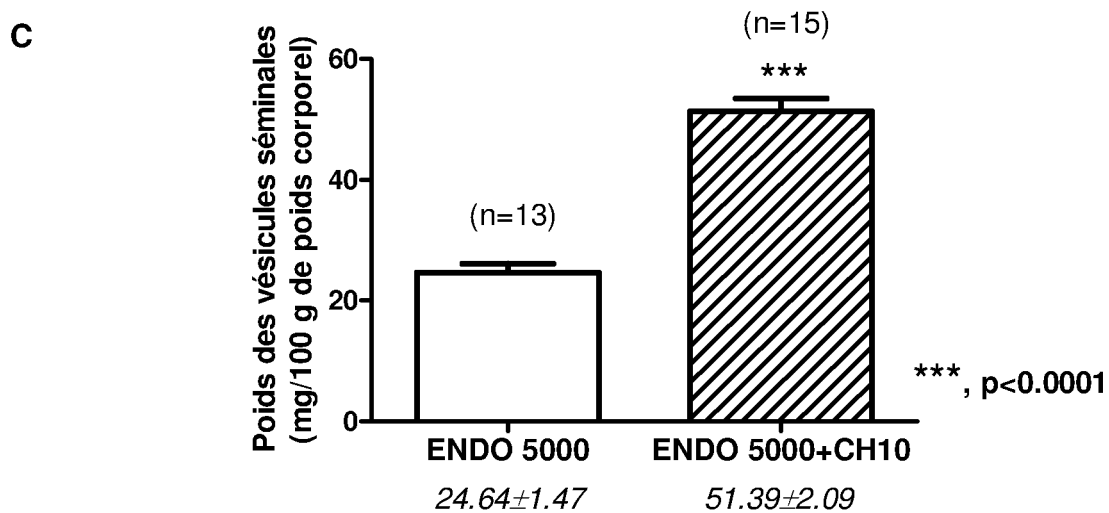
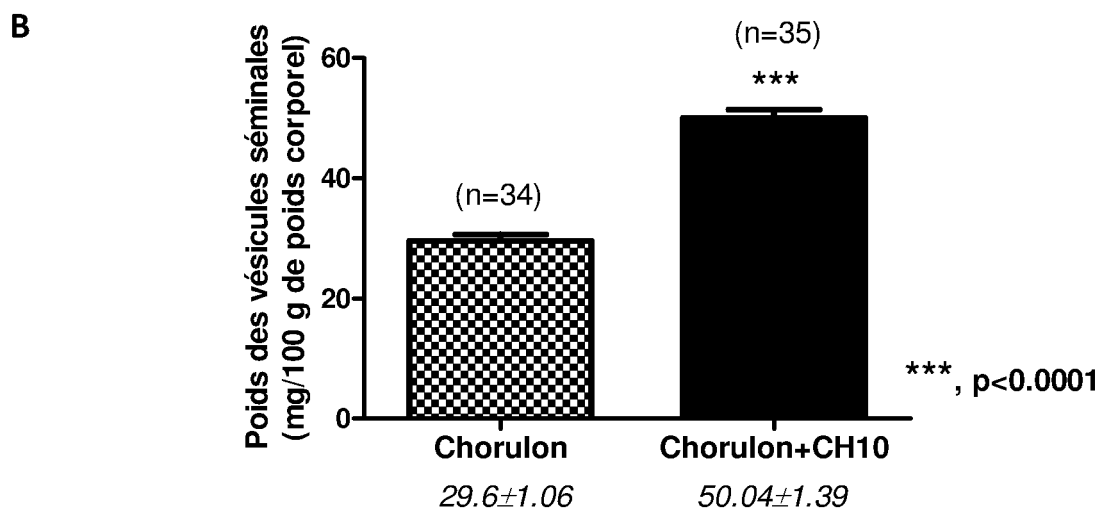
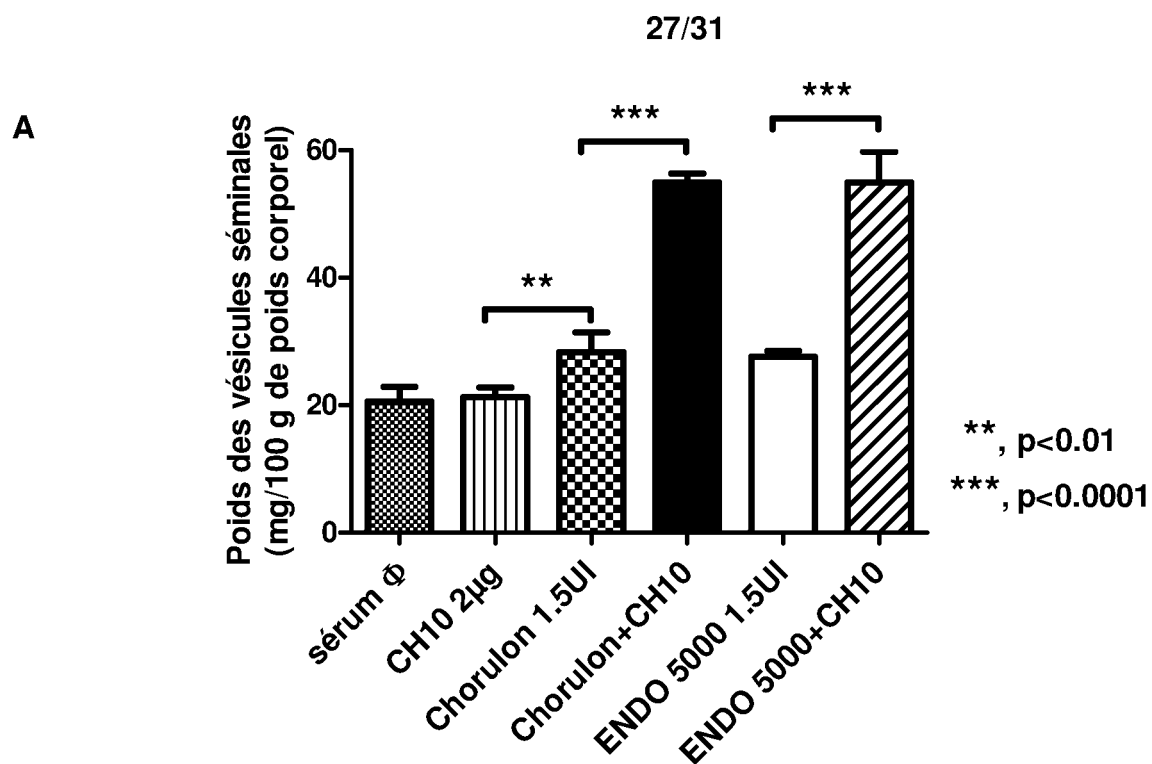


FIGURE 21

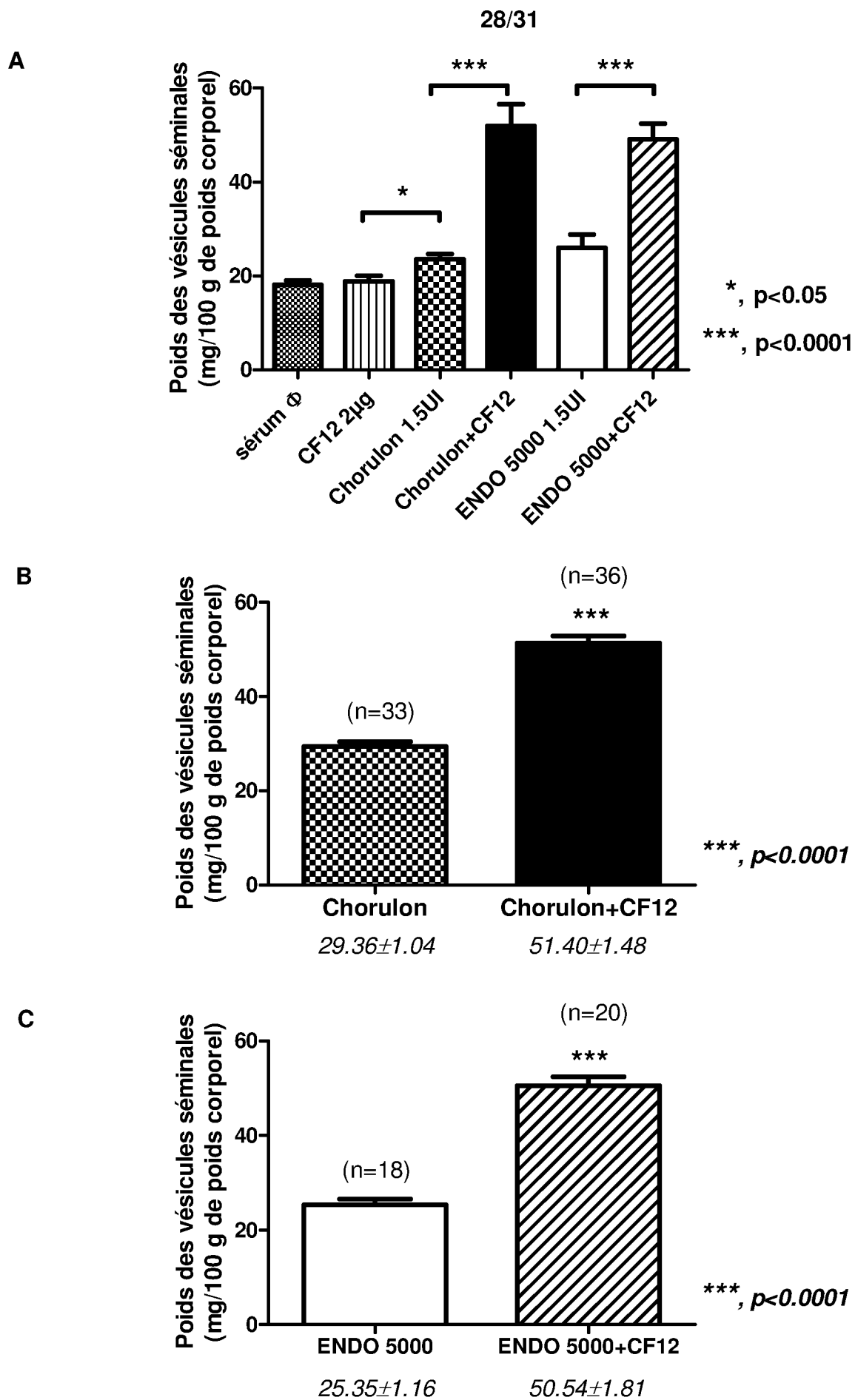


FIGURE 22

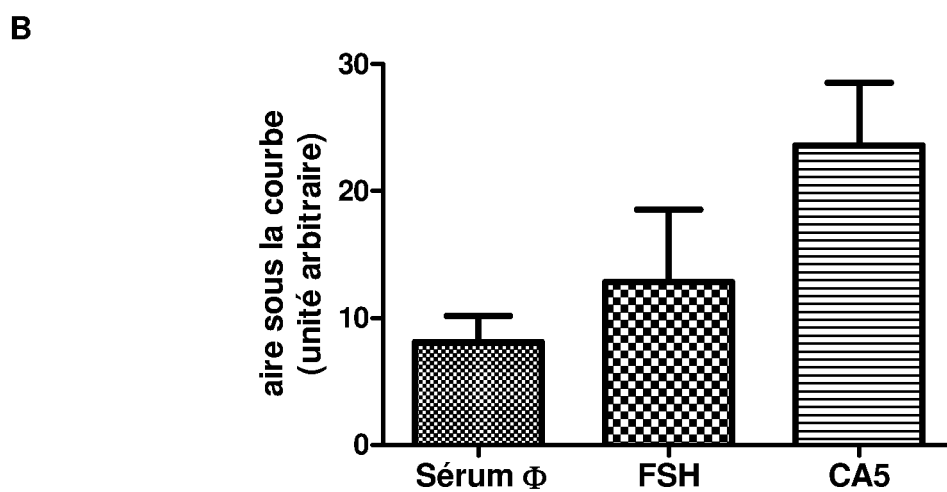
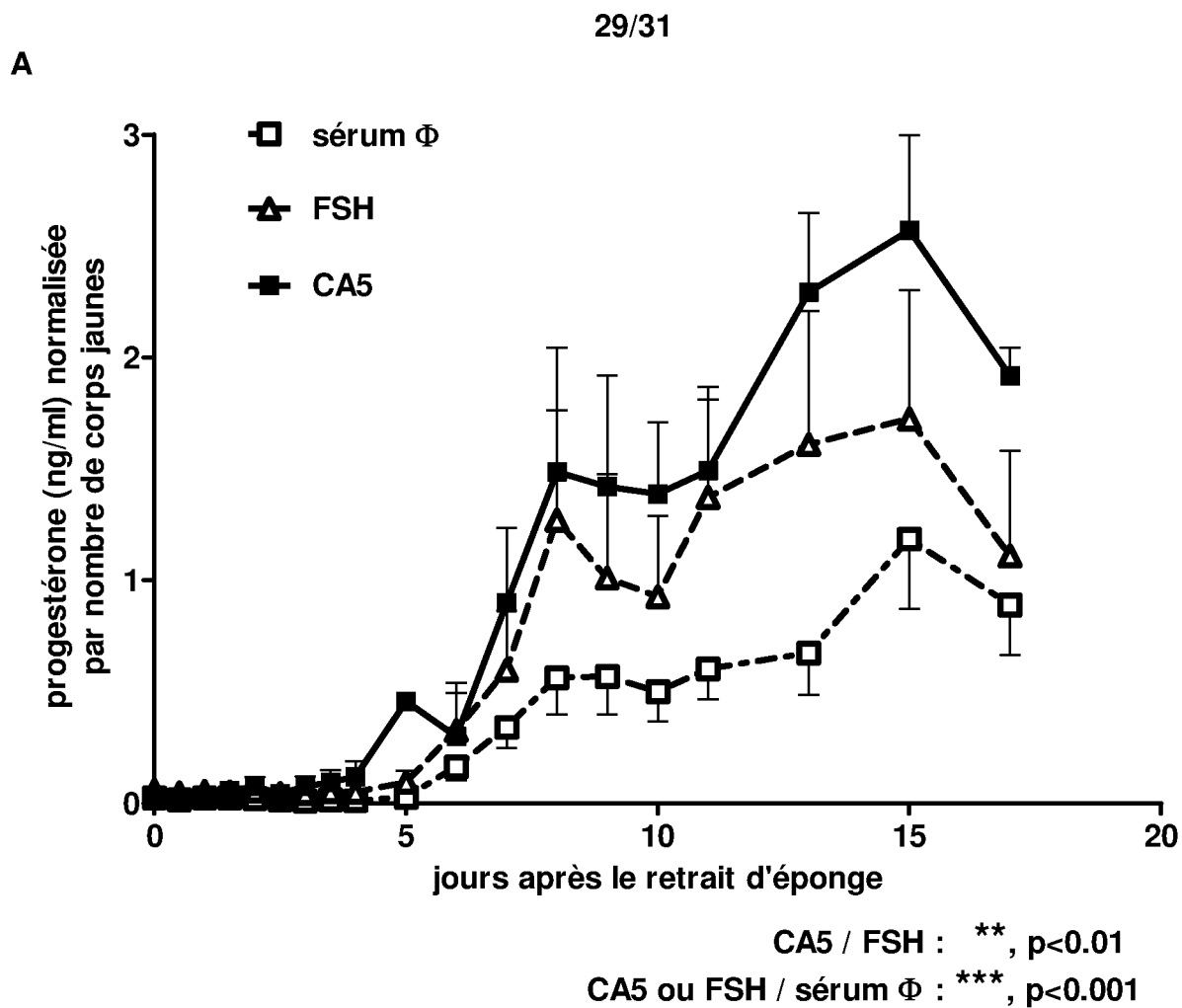


FIGURE 23

30/31

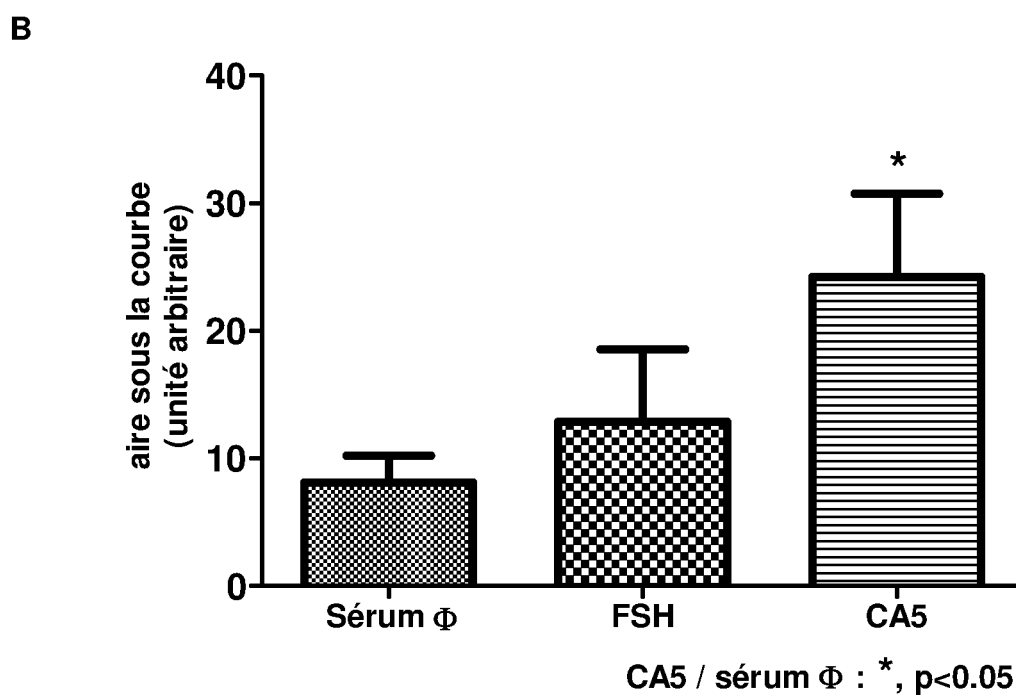
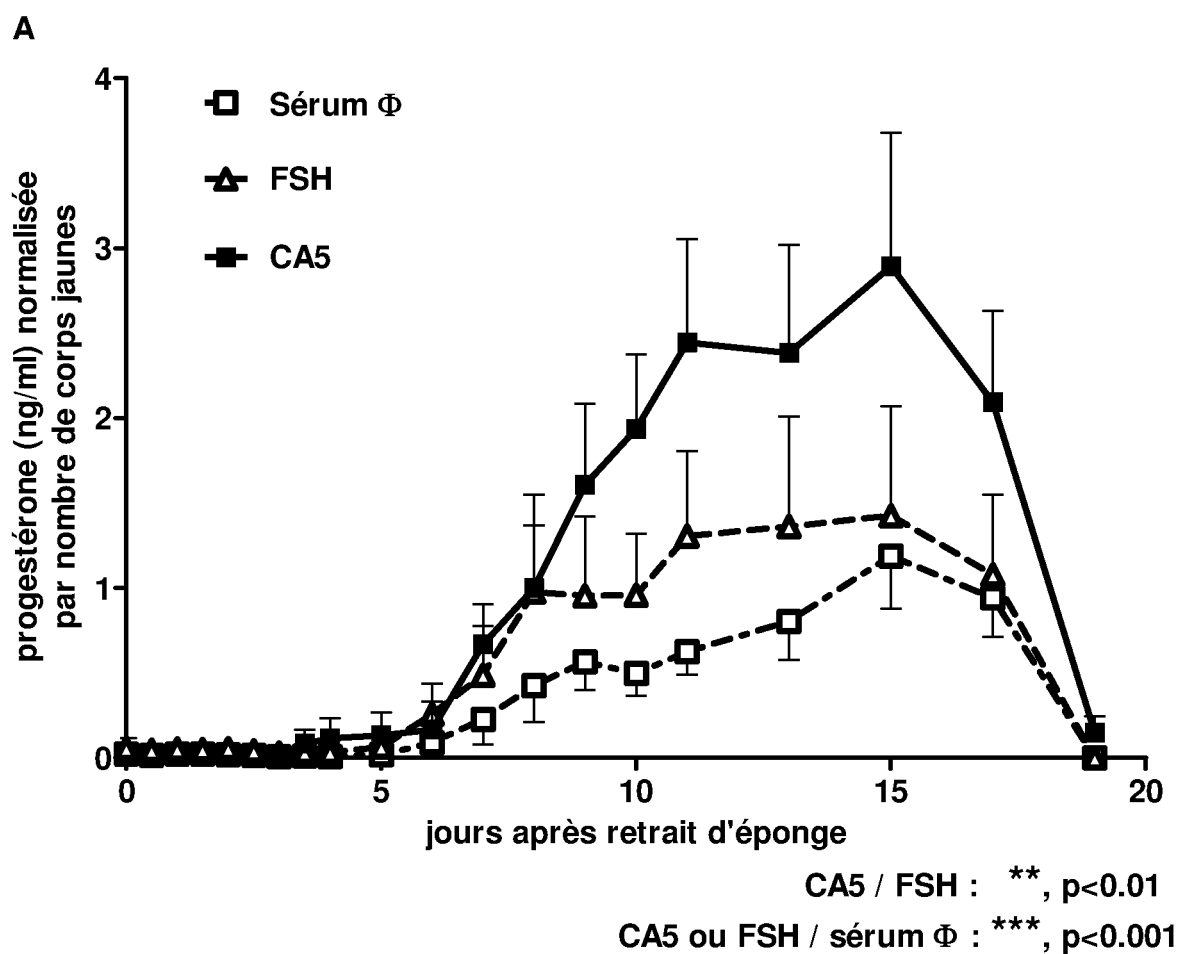
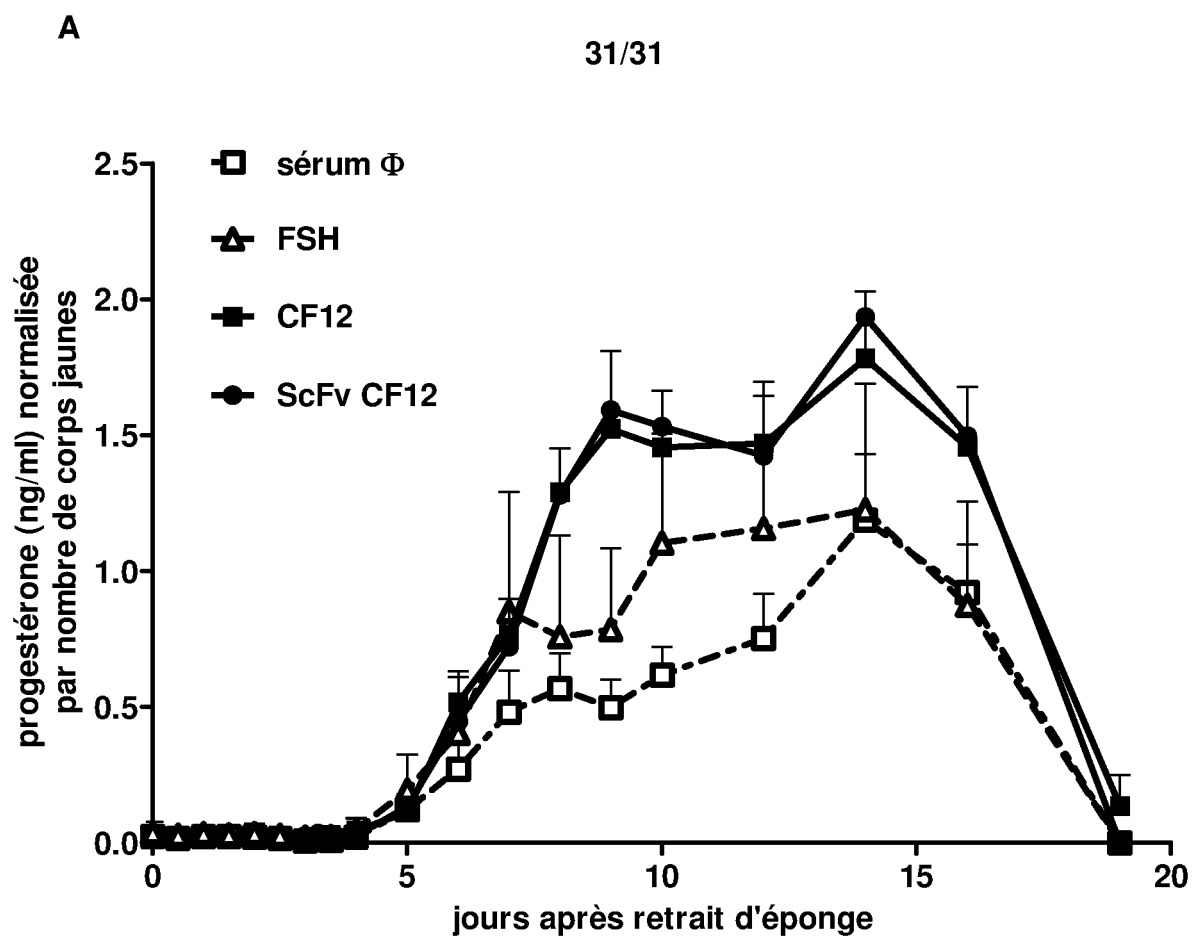
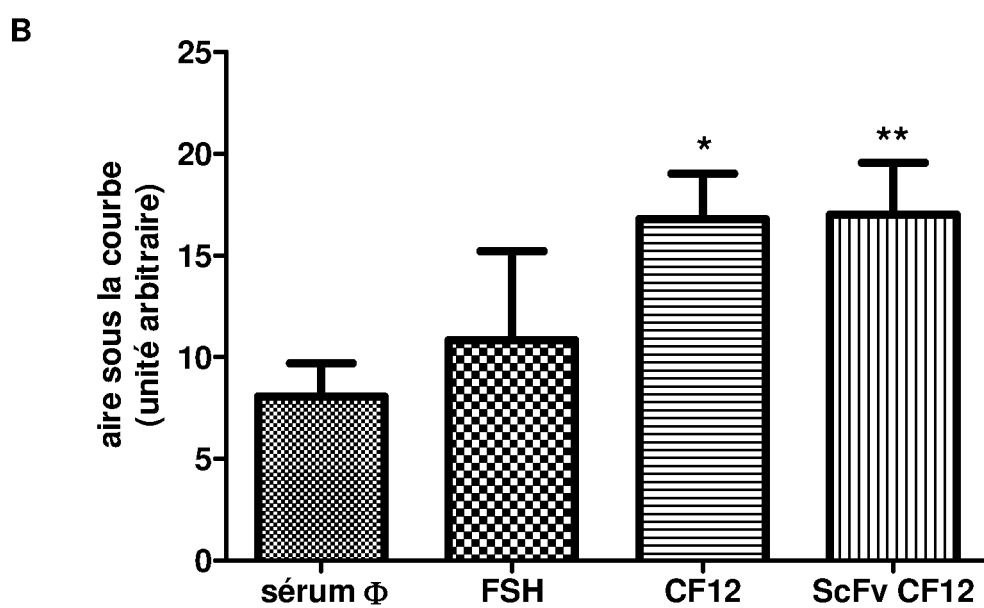


FIGURE 24



CF12 ou scFv / sérum Φ : **, $p < 0.01$

FSH / sérum Φ : ***, $p < 0.001$



CF12 / sérum Φ : *, $p < 0.05$

scFv CF12 / sérum Φ : **, $p < 0.01$

FIGURE 25

BNT213486FR00 ST25
SEQUENCE LISTING

<110> REPROPHARM
KARA, Elodie
DECOURTYE, Jérôme
CASTERET, Sophie
MAUREL, Marie-Christine

<120> LIGANDS POTENTIALLY SANTS DE LA BIOACTIVITE DES GNADOTROPINES

<130> BNT213486FR00

<160> 59

<170> Patent In version 3.5

<210> 1
<211> 351
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VH CA5

<400> 1
gaggtgaagc tggggaatc tggaggagc ttggtacagc ctgggggttc tctgagactc 60
tctgtgcaa ctctgggtt caccttcagt gatttctaca tggagtgggt ccgccagcct 120
ccagggaaga gactggagt gattgctgca agtagaaca aagct aagga ttat acaaca 180
gagtacagt gcatctgtgaa gggtcggttc atcgtctcca gagacacttc ccaaagcatc 240
ctctaccttc agatgaatgc cctgagagct gaggacactg ccatttat tctgtgcaaga 300
gatgcaaggt ttgcttactg gggccaaggg actctggtca ctgtctctgc a 351

<210> 2
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VH CA5

<400> 2
G u Val Lys Leu Val G u Ser G y G y G y Leu Val G n Pro G y G y
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser G y Phe Thr Phe Ser Asp Phe
20 25 30
Tyr Met G u Trp Val Arg G n Pro Pro G y Lys Arg Leu G u Trp Ile
35 40 45
Ala Ala Ser Arg Asn Lys Ala Lys Asp Tyr Thr Thr G u Tyr Ser Ala
50 55 60
Ser Val Lys G y Arg Phe Ile Val Ser Arg Asp Thr Ser G n Ser Ile
65 70 75 80

BNT213486FR00 ST25

Leu Tyr Leu G n Met Asn Al a Leu Arg Al a G u Asp Thr Al a Ile Tyr
85 90 95

Phe Cys Al a Arg Asp Al a Arg Phe Al a Tyr Trp G y G n G y Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Al a
115

<210> 3
<211> 339
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VL CA5

<400> 3
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ct agctgtgt cagttggaga gaagattact 60
atgagctgca agtccagtcagagcctttta t at agt agca at caaaagaa ct act tggcc 120
tggtagcagc agaaaccagg gcagctcct aaactgctga tttactgggc at cactagg 180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gt cagcaat a tt at agct at 300
cctcggacgt tccgtggagg caccaagctg gaaatcaaa 339

<210> 4
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VL CA5

<400> 4

Asp Ile Val Met Ser G n Ser Pro Ser Ser Leu Al a Val Ser Val G y
1 5 10 15

G u Lys Ile Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser G n Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn G n Lys Asn Tyr Leu Al a Trp Tyr G n G n Lys Pro G y G n
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Al a Ser Thr Arg G u Ser G y Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr G y Ser G y Ser G y Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Al a G u Asp Leu Al a Val Tyr Tyr Cys G n G n
85 90 95

BNT213486FR00 ST25

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 5
 <211> 366
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VH CH10

<400> 5
 gaggtgcagc ttgttgagtc tggaggagga ttgggcagc ct aaagggtc attgaaactc 60
 tcatgtgcag cctctgatt caccttcaat acctacgcca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccaggaaagg gtttggatg ggttgctcgc atagaagt a aaagt aat aa ttatgcaaca 180
 tattatgccg attcagtgaa agacaggttc accatctcca gagatgat t c acaaagcatg 240
 ctctatctgc aaatgaaca cttgaaaact gaggacacag ccatgtat t a ctgtgtgaga 300
 caggattact acggtagtag ctactttgac tactggggcc aaggcaccac tctcacagt c 360
 tcctca 366

<210> 6
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VH CH10

<400> 6

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Val Arg Gln Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

BNT213486FR00 ST25

Gly G n Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 7
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VL CH10

<400> 7
 gacattgtgagtgactcagtc tccagccacc ctgtctgtgactccaggaga tagagtctct 60
 ctttcctgca gggccagcca gagtattagc gactacttac actggtatca acaaaaatca 120
 catgagtctc caaggcttct catcaaatat gcttcccaat ccatctctgg gatcccctcc 180
 aggttcagtg gcagtgatc agggtcagat ttactctca gtatcaacag tgtggaacct 240
 gaagatgttg gagtgtatta ctgtcaaat ggtcacagct ttccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggaaataaa a 321

<210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VL CH10

<400> 8

Asp Ile Val Met Thr G n Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser G n Ser Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30

Leu His Trp Tyr G n G n Lys Ser His Gu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser G n Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Gu Pro
 65 70 75 80

Gu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys G n Asn Gly His Ser Phe Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Gu Ile Lys
 100 105

<210> 9
 <211> 348

BNT213486FR00 ST25

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VH CF12

<400> 9
 cagggtcaga tgcagcagtc tggagctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagctg 60
 tcctgcaaga ctctggctt caccttcagc agtagctata taagtgggtt gaagcaaaag 120
 cctggacaga gtcttgagt gattgcatgg atttatgctg gaactggtgg tactagctat 180
 aatcagaagt tcacaggcaa ggccaactg actgtagaca catcctccag cacagcctac 240
 atgcaattca gcagcctgac aactgaggac tctgccaatct attactgtgc aagacacggg 300
 tcctactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctca 348

<210> 10
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VH CF12

<400> 10

G n G y G n Met G n G n Ser G y Al a G u Leu Val Lys Pro G y Al a
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser G y Phe Thr Phe Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Ile Ser Trp Leu Lys G n Lys Pro G y G n Ser Leu G u Trp Ile
 35 40 45

Al a Trp Ile Tyr Al a G y Thr G y G y Thr Ser Tyr Asn G n Lys Phe
 50 55 60

Thr G y Lys Al a G n Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Al a Tyr
 65 70 75 80

Met G n Phe Ser Ser Leu Thr Thr G u Asp Ser Al a Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Al a Arg His G y Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp G y G n G y Thr Thr Leu
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 11
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

BNT213486FR00 ST25

<223> VL CF12

<400> 11

gacattgtgc t gacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctaggcca gagggccacc 60
atctcctgca aggccagcca aagtgtgat t at gat ggt g at agt t at at gaact ggt ac 120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa tctagaatct 180
gggatcccag ccaggtttag tggcagtggt tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
cctgtggagg aggaggatgc t gcaacct at t act gt cagc aaagt aat ga ggat ccgt ac 300
acgttcggag gggggaccaa gctggaaat a aaa 333

<210> 12

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL CF12

<400> 12

Asp Ile Val Leu Thr G n Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
G n Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser G n Ser Val Asp Tyr Asp
20 25 30
Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr G n G n Lys Pro Gly G n Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80
Pro Val Gu Gu Gu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys G n G n Ser Asn
85 90 95
Gu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Gu Ile Lys
100 105 110

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH-CDR1 CA5

<400> 13

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Phe Tyr
1 5

BNT213486FR00 ST25

<210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VH-CDR2 CA5

<400> 14

Ser Arg Asn Lys Ala Lys Asp Tyr Thr Thr
 1 5 10

<210> 15
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VH-CDR3 CA5

<400> 15

Ala Arg Asp Ala Arg Phe Ala Tyr
 1 5

<210> 16
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VL-CDR1 CA5

<400> 16

Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr
 1 5 10

<210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VL-CDR3 CA5

<400> 17

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg Thr
 1 5

<210> 18
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VH-CDR1 CH10

<400> 18

Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala
 1 5

BNT213486FR00 ST25

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VH-CDR2 CH10

<400> 19

I l e A r g S e r L y s S e r A s n A s n T y r A l a T h r
 1 5 10

<210> 20
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VH-CDR3 CH10

<400> 20

V a l A r g G n A s p T y r T y r G y S e r S e r T y r P h e A s p T y r
 1 5 10

<210> 21
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VL-CDR1 CH10

<400> 21

G n S e r I l e S e r A s p T y r
 1 5

<210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VL-CDR3 CH10

<400> 22

G n A s n G y H i s S e r P h e P r o T y r T h r
 1 5

<210> 23
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VH-CDR1 CF12

<400> 23

BNT213486FR00 ST25

G y Phe Thr Phe Ser Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 24
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VH-CDR2 CF12

<400> 24

I l e Tyr A l a G y Thr G y G y Thr
 1 5

<210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VH-CDR3 CF12

<400> 25

A l a A r g H i s G y Ser Tyr Phe A s p Tyr
 1 5

<210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VL-CDR1 CF12

<400> 26

G n Ser Val Asp Tyr Asp G y Asp Ser Tyr
 1 5 10

<210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VL-CDR3 CF12

<400> 27

G n G n Ser A s n G u Asp Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 28
 <211> 771
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> scFv CA5

BNT213486FR00 ST25

<400> 28
 caggt gcagc tgcagcagc aggcggcggc ct ggt acaac ct ggt ggct c act gcgct g 60
 agct gcgcaa ccagcgggt t t acct t t agc gat t t ct aca t ggaat ggggt t cgccaaccg 120
 ccgggt aagc gt ct ggaat g gat cgcgggc agccgt aaca aggcgaaaga t t at accact 180
 gaat at agcg cgt cggg gaa aggt cgct t c at t gt ct cgc gcgat accag ccagt cgat t 240
 ct gt at ct gc aaat gaat gc cct gcgt gcc gaagacacgg ccat ct act t ct gt gcgct 300
 gat gcacgct t t gcct at t g gggccaaggc accct ggt ga ccgt t agcgc cggg ggt ggc 360
 ggt t caggt g gt ggcggg ag cggg ggcggg ggct cagat a t t cagat gac ccagaccccg 420
 t caagcct gg cggg gt cagt cggcgaagag at t act at ga gct gt aaaag ct cgcagagc 480
 ct gct gt act cat cgaacca gaaaaat t ac ct ggcat ggt at caacagaa gccgggt cag 540
 t cgccgaaac t gct gat ct a ct gggcct ca acccgt gaga gcggcgt acc ggat cgct t t 600
 act ggcagcg gcagcggcac ggact t t acg ct gacgat t a gct cggg gaa ggccgaagac 660
 ct ggcggg t t at t at t gcc aacgt act at agct accct c gt acct t cgg cggcggcacg 720
 aaact cgaga t t aaacat ca ccat cacat cact aact cg agat caagt a a 771

<210> 29
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> scFv CA5

<400> 29
 G n Val G n Leu G n G n Ser G y G y G y Leu Val G n Pro G y G y
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Al a Thr Ser G y Phe Thr Phe Ser Asp Phe
 20 25 30
 Tyr Met G u Trp Val Arg G n Pro Pro G y Lys Arg Leu G u Trp Ile
 35 40 45
 Al a Al a Ser Arg Asn Lys Al a Lys Asp Tyr Thr Thr G u Tyr Ser Al a
 50 55 60
 Ser Val Lys G y Arg Phe Ile Val Ser Arg Asp Thr Ser G n Ser Ile
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu G n Met Asn Al a Leu Arg Al a G u Asp Thr Al a Ile Tyr
 85 90 95
 Phe Cys Al a Arg Asp Al a Arg Phe Al a Tyr Trp G y G n G y Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Al a G y G y G y G y Ser G y G y G y G y Ser G y
 115 120 125

BNT213486FR00 ST25

G y G y G y Ser Asp Ile G n Met Thr G n Thr Pro Ser Ser Leu Al a
 130 135 140

Val Ser Val G y G u G u Ile Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser G n Ser
 145 150 155 160

Leu Leu Tyr Ser Ser Asn G n Lys Asn Tyr Leu Al a Trp Tyr G n G n
 165 170 175

Lys Pro G y G n Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Al a Ser Thr Arg
 180 185 190

G u Ser G y Val Pro Asp Arg Phe Thr G y Ser G y Ser G y Thr Asp
 195 200 205

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Al a G u Asp Leu Al a Val Tyr
 210 215 220

Tyr Cys G n G n Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg Thr Phe G y G y G y Thr
 225 230 235 240

Lys Leu G u Ile Lys His His His His His His
 245 250

<210> 30
 <211> 768
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> scFv CH10

<400> 30
 caggtgcagc tgcagcaatc aggcggcggc ct ggt ccaac cgaaaggt ag cct gaaact g 60
 t cgt gcgccg ccagcggct t tacgt t caac act t acgcga t gaat t gggg gcgt caggcg 120
 cct ggt aaag gcct ggaat g ggt ggcacgc at ccgt t caa aaagcaacaa t t acgcgacg 180
 t at t at gcag acagcgt aaa agat cgct t t accat cagcc gt gat gat t c acagt caat g 240
 ct gt acct gc aaat gaat aa cct gaaaact gaagacact g cgat gt at t a t t gt gt t cgc 300
 caggact at t acggt agct c gt at t t cgat t act ggggcc aaggcaccac cct gacggt g 360
 agct cgggt g gcggt ggct c aggt ggt ggt ggt agcggcg gt ggcggt ag cgat at ccag 420
 at gaccaga ccccggaac cct gagcgt t acccct ggt g accgcgt t t c gct gagct gc 480
 cgt gcct cgc agagcat t t c ggact at ct g cact ggt at c agcaaaaat c acacgaat ca 540
 ccgct ct gc t gat t aagt a cgccagccaa t cgat t agcg gt at t ccgag ccgct t t t cg 600
 ggct cgggt t cgggct cgga t t t t accct g t caat t aat a gcgt agagcc ggaagat gt a 660
 ggcgt ct act at t gt cagaa cggccat t ca t t cccgt aca cgt t t ggcgg cggcaccaag 720
 ct cgagat t a agcat cacca t cat caccat t aact cgaga t caagt aa 768

BNT213486FR00 ST25

<210> 31
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> scFv CH10

<400> 31

G n Val G n Leu G n G n Ser G y G y G y Leu Val G n Pro Lys G y
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Al a Al a Ser G y Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30

Al a Met Asn Trp Val Arg G n Al a Pro G y Lys G y Leu G u Trp Val
 35 40 45

Al a Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Al a Thr Tyr Tyr Al a Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser G n Ser Met
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu G n Met Asn Asn Leu Lys Thr G u Asp Thr Al a Met Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Val Arg G n Asp Tyr Tyr G y Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

G y G n G y Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser G y G y G y G y Ser G y
 115 120 125

G y G y G y Ser G y G y G y G y Ser Asp Ile G n Met Thr G n Thr
 130 135 140

Pro Al a Thr Leu Ser Val Thr Pro G y Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys
 145 150 155 160

Arg Al a Ser G n Ser Ile Ser Asp Tyr Leu Hi s Trp Tyr G n G n Lys
 165 170 175

Ser Hi s G u Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Al a Ser G n Ser Ile
 180 185 190

Ser G y Ile Pro Ser Arg Phe Ser G y Ser G y Ser G y Ser Asp Phe
 195 200 205

Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val G u Pro G u Asp Val G y Val Tyr Tyr
 210 215 220

BNT213486FR00 ST25

Oys G n Asn G y H i s Ser Phe Pro Tyr Thr Phe G y G y G y Thr Lys
 225 230 235 240

Leu G u l l e Lys H i s H i s H i s H i s H i s
 245 250

<210> 32
 <211> 765
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> scFv CF12

<400> 32
 cagg tgcagc tgcagcag t c ggg t ggcgca gagct ggt ga aaccgggt gc gagcgt t aaa 60
 ct gagct gca aaact agcgg ct t t acct t t agct cgt cat at at t t cgt g gct gaagcag 120
 aaaccgggcc agt cact gga at ggat t gcg t ggat ct acg caggcacggg t ggcacct ca 180
 t at aat caga aat t caccgg t aaagcgcaa ct gacgg t cg at accagcag cagcacggcg 240
 t acat gcagt t cagct cgct gaccact gaa gat agcgcaa t ct act at t g t gcacgccat 300
 ggt t cgt act t cgact at t g gggccagggc accacct ga ccgt t t caag cggt ggt ggt 360
 ggt agcgg t g gt ggt ggt t c aggt ggcggc ggct cagat a t t cagat gac ccagaccct 420
 gcgagcct gg cagt gt cact gggccaacgc gcaacct ct cgt gt aaagc ct cgagagc 480
 gt ggat t at g acggcgat ag ct acat gaac t ggt at cagc aaaagcct gg t caaccgccg 540
 aagct gct ga t t t acgccgc cagcaacct g gaat cgggca t cccggccc t t t t agcggc 600
 t caggct cgg gt act gact t cacgct gaac at t caccgg t agaagaaga agacgcggcc 660
 acgt at t act gccagcaaag caat gaagac ccgt acact t t t ggcggcgg cagcaaact c 720
 gagat caaac accat cacca t caccat t aa ct cgagat ca agt aa 765

<210> 33
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> scFv CF12

<400> 33

G n Val G n Leu G n G n Ser G y G y Al a G u Leu Val Lys Pro G y
 1 5 10 15

Al a Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser G y Phe Thr Phe Ser Ser
 20 25 30

Ser Tyr l l e Ser Trp Leu Lys G n Lys Pro G y G n Ser Leu G u Trp
 35 40 45

l l e Al a Trp l l e Tyr Al a G y Thr G y G y Thr Ser Tyr Asn G n Lys
 50 55 60

BNT213486FR00 ST25

Phe Thr Gly Lys Ala Gln Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala
65 70 75 80

Tyr Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Thr Gu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg His Gly Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ala
130 135 140

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser
145 150 155 160

Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
165 170 175

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gu Ser
180 185 190

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
195 200 205

Leu Asn Ile His Pro Val Gu Gu Gu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
210 215 220

Gln Gln Ser Asn Gu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
225 230 235 240

Gu Ile Lys His His His His His His
245

<210> 34

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VHRv1

<400> 34

cgggatcctc tagaggtcca actgcaggag tcagg

35

<210> 35

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

BNT213486FR00 ST25

<223> VHFor
 <400> 35
 caggggccag tggat agac 19

<210> 36
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> MKRev5

<400> 36
 gacattgtga tgaccagtc t 21

<210> 37
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> MKC5For

<400> 37
 ggat acagtt ggtgcagcat c 21

<210> 38
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CA5VH_Fw

<400> 38
 cacttttaca tggatccag tg 22

<210> 39
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CA5VH_Rev

<400> 39
 gtttctactt gcagcaatcc act 23

<210> 40
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CA5VL_Fw

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> W= A ou T

BNT213486FR00 ST25

<220>
 <221> mi sc_feat ure
 <222> (10)..(10)
 <223> R = G ou A

 <220>
 <221> mi sc_feat ure
 <222> (18)..(18)
 <223> Y = T ou C

 <400> 40
 gawt cacagr cccaggt yc 19

 <210> 41
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> CA5VL_Rev

 <400> 41
 cccagtaaat cagcagttta gga 23

 <210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> MuCFor

 <400> 42
 ggggaagaca tttggaagg 20

 <210> 43
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> MKRev2

 <400> 43
 gat attgtga tgacgcaggc t 21

 <210> 44
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> MKRev3

 <400> 44
 gat attgtga taaccag 18

 <210> 45
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>

BNT213486FR00 ST25

<223> MKRev4
 <400> 45
 gacattgtgc tgaccaatc t 21

<210> 46
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> MKRev6
 <400> 46
 gatattgtgc taactcagtc t 21

<210> 47
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> MKRev8
 <400> 47
 gacatccagc tgactcagtc t 21

<210> 48
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> MKC5for
 <400> 48
 ggat acagtt ggtgcagcat c 21

<210> 49
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CH10VH_Fw
 <400> 49
 at ggtgttgg ggctgaagt g 20

<210> 50
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CH10VH_Rev
 <400> 50
 cagttcatgg cgt aggtatt ga 22

<210> 51
 <211> 20

BNT213486FR00 ST25

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> CH10VL_Fw

 <400> 51
 ttctggaytt cagcctccag 20

<210> 52
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> CH10VL_Rev

 <400> 52
 gattggaag catattgat gag 23

<210> 53
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> VHRev2

 <400> 53
 agatctagaa agcttaggtc aagctgcagc agtcagg 37

<210> 54
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> CF12VH_F

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> K = G ou T

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> W = A ou T

 <400> 54
 cagkaactgc aggtgtccwct 21

<210> 55
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> CF12VH_Rev

 <400> 55
 ctggaggatg tgtctacagt cag 23

BNT213486FR00 ST25

<210> 56
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CF12VL_Fw

<400> 56
 ctgctatgggtgctgctgctc 21

<210> 57
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CF12VL_Rev

<400> 57
 agattggatgcagcatagatgag 23

<210> 58
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Lieur

<400> 58

G y G y G y G y Ser G y G y G y G y Ser G y G y G y Ser
 1 5 10

<210> 59
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Fragment VL de scFv

<400> 59

Leu G u l l e L y s H i s H i s H i s H i s H i s L e u G u l l e L y s V a l A s p
 1 5 10 15



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 804470
FR 1458469

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	GLENCROSS R G ET AL: "Monoclonal antibody enhancement of FSH-induced uterine growth in snell dwarf mice", JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY, SOCIETY FOR ENDOCRINOLOGY, GB, vol. 136, no. 3, 1 mars 1993 (1993-03-01), pages R5-R7, XP009145848, ISSN: 0022-0795, DOI: 10.1677/JOE.0.136R005 * figure 2 * * page R7 *	1-13	C07K16/26 A61K39/395 A61K38/24 A61P5/06 A61P5/24 A61P15/08
X	WO 97/12038 A1 (BABRAHAM INST [GB]; BONO GABRIELE [IT]; FERASIN LUCA [IT]; BEATTIE JAM) 3 avril 1997 (1997-04-03) * page 13 * * page 3 *	1-13	
A	US 2002/102613 A1 (HOOGENBOOM HENDRICUS RENERUS J [NL]) 1 août 2002 (2002-08-01) * alinéa [0375] *	1-13	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
A,D	WO 2012/066519 A1 (AGRONOMIQUE INST NAT RECH [FR]; MAUREL MARIE-CHRISTINE [FR]; REITER ER) 24 mai 2012 (2012-05-24) * le document en entier *	1-13	C07K A61K
A	ALFREDO ULLOA-AGUIRRE ET AL: "Novel pathways in gonadotropin receptor signaling and biased agonism", REVIEWS IN ENDOCRINE AND METABOLIC DISORDERS, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, BO, vol. 12, no. 4, 28 avril 2011 (2011-04-28) , pages 259-274, XP019972343, ISSN: 1573-2606, DOI: 10.1007/S11154-011-9176-2 * le document en entier *	1-13	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
1 avril 2015		Wagner, René	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		D : cité dans la demande	
A : arrière-plan technologique		L : cité pour d'autres raisons	
O : divulgation non-écrite			
P : document intercalaire		& : membre de la même famille, document correspondant	

2

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1458469 FA 804470**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **01-04-2015**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9712038	A1	03-04-1997	AU 704010 B2	01-04-1999
			AU 7090096 A	17-04-1997
			CA 2232950 A1	03-04-1997
			EP 0858508 A1	19-08-1998
			JP 2000508293 A	04-07-2000
			WO 9712038 A1	03-04-1997

US 2002102613	A1	01-08-2002	US 2002102613 A1	01-08-2002
			US 2008108514 A1	08-05-2008
			US 2014200165 A1	17-07-2014

WO 2012066519	A1	24-05-2012	AU 2011330743 A1	20-06-2013
			CA 2818463 A1	24-05-2012
			CN 103328510 A	25-09-2013
			EP 2640748 A1	25-09-2013
			FR 2967676 A1	25-05-2012
			US 2013315928 A1	28-11-2013
			WO 2012066519 A1	24-05-2012
