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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
15 mai 2003 (15.05.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/040188 A1

(51) Classification internationale des brevets[7] :
C07K 16/44, 16/06, A61K 39/395, A61P 19/02, 31/00, 37/00

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/03854

(22) Date de dépôt international :
8 novembre 2002 (08.11.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
01/14518 9 novembre 2001 (09.11.2001) FR

(71) Déposant *(pour tous les États désignés sauf US)* : **LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES** [FR/FR]; Zone d'Activité de Courtaboeuf, 3, avenue des Tropiques, F-91940 Les Ulis (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants *(pour US seulement)* : **BOUREL, Dominique** [FR/FR]; 35, avenue Germaine, F-59110 La Madeleine (FR). **BRULEY-ROSSET, Martine** [FR/FR]; 115, quai de Bonneuil, F-94210 La Varenne (FR). **DHAINAUT, Frédéric** [FR/FR]; 4, rue de Dourdan, Le Rotoir, F-91870 Boissy-le-Sec (FR). **LIROCHON, Jacky** [FR/FR]; 7, rue des Vignes, F-91650 Breuillet (FR).

(74) Mandataires : **MARTIN, Jean-Jacques** etc.; Cabinet Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).

(81) États désignés *(national)* : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés *(régional)* : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :
— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement*

Publiée :
— *avec rapport de recherche internationale*
— *avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues*

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

WO 03/040188 A1

(54) **Title:** ANTIBODY STIMULATING IL-1RA PRODUCTION

(54) **Titre :** ANTICORPS STIMULANT LA PRODUCTION D'IL-1RA

(57) **Abstract:** The invention concerns natural antibodies eventually monoclonal capable of inducing a high production of IL-1Ra with monocytes or macrophages and the use of said antibodies for treating inflammatory or autoimmune diseases.

(57) **Abrégé :** La présente invention se rapporte à des anticorps naturels éventuellement monoclonaux capables d'induire une forte production d'IL-1Ra par des monocytes ou des macrophages et à l'utilisation desdits anticorps pour le traitement de maladies inflammatoires ou autoimmunes.

Anticorps stimulant la production d'IL-1Ra

La présente invention se rapporte à l'utilisation d'anticorps naturels de classe IgG capables d'induire une forte production d'IL-1Ra par des monocytes ou des macrophages et à l'utilisation desdits anticorps pour le traitement de maladies inflammatoires ou autoimmunes.

L'IL-1 est une cytokine correspondant à deux protéines (IL-1a et IL-1b) qui jouent un rôle clé dans la réponse inflammatoire (Dinarello CA, Blood, 1996, 87: 2095, 2137). Bien que l'IL-1 soit considérée comme le produit de macrophages activés, elle est également synthétisée par des cellules lymphoïdes et non lymphoïdes comme les cellules vasculaires, épithéliales, cutanées, nerveuses, dendritiques, fibroblastiques et chondrocytaires. Elle est considérée comme un médiateur central de la réponse de l'hôte à l'infection et à d'autres formes de traumatismes.

L'IL-1 est une cytokine multi-fonctionelle agissant sur une grande variété de cellules du système immunitaire mais aussi d'autres systèmes cellulaires. L'IL-1 agit directement sur le système nerveux central, induit l'inhibition de la sécrétion d'insuline par les cellules des îlots du pancréas et stimule les réponses immunitaires cellulaires, humorales et naturelles.

L'IL-1α et l'IL-1β agissent en se liant à des récepteurs de surface exprimés sur de nombreuses cellules et déclenchent une série de signaux ayant des effets sur la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'induction de cytokines, la production de prostaglandines, l'activation de récepteurs et la sécrétion d'enzymes de dégradation.
Il existe deux récepteurs qui interagissent avec IL-1a et IL-1b : le récepteur de type I (80Kd) exprimé sur les cellules T, les fibroblastes et les cellules épithéliales, qui requiert une interaction avec l'IL1RacP (IL-1 accessory protein) pour transmettre le signal et le récepteur de type II (67Kd) exprimé sur les cellules B, les neutrophiles et

les macrophages qui ne peut pas transmettre le signal parce qu'il manque la partie intracellulaire.

Un troisième membre de la famille de l'IL-1, l'IL-1Ra (IL-1 receptor antagonist), agit comme antagoniste naturel de l'IL-1a et IL-1b et interagit avec le récepteur de l'IL-1 de type I mais ne transduit pas le signal intracellulaire ou une réponse biologique. Ces trois protéines ont en commun 25 à 30% des acides aminés. L'IL-1Ra s'associe mal au récepteur de type II.

L'IL-1 est considéré comme un médiateur de la défense de l'hôte contre les infections mais aussi de nombreuses pathologies et un niveau élevé d'IL-1 circulant corrèle avec une variété de situations cliniques et en particulier le choc septique. Son activité est finement régulée au niveau de la transcription, traduction et sécrétion. D'autres mécanismes régulateurs mettent en jeu l'action d'autres cytokines, la différence d'expression des récepteurs à l'IL-1 et la production d'inhibiteur naturel comme l'IL-1Ra.

De nombreuses études expérimentales et quelques essais cliniques ont montré le rôle protecteur de l'IL-1Ra dans un certain nombre de pathologies : choc septique, arthrite rhumatoïde, le rejet de greffe, attaque et ischémie cardiaque.
L'IL-1Ra peut agir comme un compétiteur de l'IL-1 et donc représente un agent thérapeutique intéressant. WO 95/16706, WO 99/36541, WO 01/42305, WO 01/41792 et WO 01/42304 décrivent le peptide IL-1Ra, des peptides mutés et leur utilisation pour le traitement de diverses pathologies.

Cependant, si les essais thérapeutiques utilisant l'IL-1Ra recombinant soluble ont montré une bonne efficacité de ce produit dans le choc septique, l'arthrite rhumatoïde et la GVH, les doses nécessaires très élevées et la courte demi-vie de l'IL-1Ra recombinant sont des obstacles à son utilisation.

Dès lors, toute stratégie visant à stimuler spécifiquement la production d'IL-1Ra et donc à inhiber l'activité inflammatoire de l'IL-1 présente un intérêt thérapeutique dans

le traitement d'un certain nombre de pathologies inflammatoires aiguës ou chroniques comme l'arthrite rhumatoïde , la GVH et autres.

La présente invention porte sur l'utilisation d'anticorps capables de stimuler fortement la production *in vitro (*et *in vivo)* de l'IL-1Ra (Interleukin 1 receptor antagonist), mais pas celle d'une cytokine pro-inflammatoire l'IL-1b (Interleukin 1b et 1a). Ces anticorps humains de type IgG ont pour caractéristique de reconnaître en ELISA des protéines du soi telles que l'actine, la myosine, la tubuline, l'ADN ou la protéine basique de la myéline (MBP) mais pas des antigènes vaccinaux comme l'anatoxine tétanique. Ils sont sélectionnés également par leur capacité à se lier à l'haptène Dinitrophenyl ou DNP.

Ces anticorps peuvent donc se substituer avantageusement à l'IL-1Ra pour toutes applications thérapeutiques et répondent aux problèmes évoqués précédemment.

Description

Ainsi, dans un premier aspect, l'invention se rapporte à des anticorps naturels de classe IgG réagissant avec l'haptène DNP et au moins un autoantigène sélectionné parmi la myosine, l'actine, la protéine basique de la myéline (MBP) et la tubuline, caractérisé en ce qu'il induit une surexpression de l'IL-1Ra au niveau de l'ARNm et de la protéine sécrétée.

Le terme « surexpression » signifie que le taux d'expression de l'IL-1Ra est au moins 50% supérieur au taux d'expression des cellules non stimulées par les anticorps de l'invention.

Par « anticorps naturels de classe IgG», on entend désigner des anticorps, des fractions ou sous-populations d'anticorps ou des anticorps monoclonaux présentant une réactivité vis-à-vis d'antigènes du soi. Les sous-populations d'IgG sont préparées à partir d'Ig polyvalentes ou toute autre fraction intermédiaire obtenue au cours du procédé de fabrication des IgIV à usage thérapeutique.

Avantageusement, de tels anticorps naturels ne réagissent pas avec l'anatoxine tétanique et d'autres antigènes du non soi.

Plus spécifiquement, ils présentent une réactivité vis-à-vis de l'haptène DNP supérieure à 100, 125 ou 150 par rapport aux IgIV, notamment par rapport à TEGELINE®. En outre, ces anticorps présentent un taux de réactivité vis-à-vis d'au moins un autoantigène sélectionné parmi l'ADN, la myosine, la MBP, l'actine et la tubuline supérieur à 50, 75 ou 100 par rapport aux IgIV polyvalentes, notamment par rapport à TEGELINE®. Le taux d'enrichissement peut être calculé par rapport à l'activité des Ig polyvalentes initiales comme valeur contrôle dans le cas de sous-populations d'IgG ou par rapport à un anticorps monoclonal de référence dans le cas où l'anticorps naturel est un anticorps monoclonal.

Dans un deuxième aspect, l'invention porte sur un procédé de préparation d'une sous-population d'IgG définie précédemment caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) préparation d'un support insoluble sur lequel est greffé du DNP-lysine,
b) adsorption d'Ig polyvalentes sur le support obtenu à l'étape a),
c) élution des Ig retenues sur le support de façon à recueillir la fraction interagissant avec le DNP,
d) sélection des fractions présentant une réactivité vis-à-vis d'autoantigènes donnés, et
e) sélection des fractions induisant la surexpression de l'IL-1Ra par les macrophages ou les monocytes.

Le procédé général de préparation d'Ig polyvalentes est connu de l'homme du métier et comporte essentiellement les étapes suivantes :

- Fractionnement du plasma provenant d'un pool de donneurs par précipitation, adsorption et filtration puis ultrafiltration (obtention d'une première fraction " PSO 1"),

Traitement par la pepsine à pH acide, formulation, répartition, et lyophilisation (obtention du produit TEGELINE®),

- Bien entendu, les Ig polyvalentes peuvent être préparées en utilisant d'autres procédés.

Actuellement, la tolérance et l'efficacité des IgG polyvalentes commercialisées, notamment TEGELINE® (LFB, France) sont reconnues en particulier dans le traitement du PTI, de la maladie de Kawasaki et de la rétinochoroïdite de type "Birdshot", pathologies pour lesquelles des AMM ont été obtenues.

On entend par " Ig polyvalentes " dans le cadre de l'invention, des IgG polyvalentes entières, des fragments d'IgG polyvalentes tels que F(ab')2 ou F(ab) et toutes fractions intermédiaires obtenues au cours du procédé de fabrication des IgIV polyvalentes.

L'étape a) peut être mise en œuvre par greffage de DNP-Lysine sur un support solide, notamment sur un gel de Sepharose®, de Trisacryl®, d'Affiprep®, d'Affigel® , gels activés avec CNBr, NHS ou $C_5H_8O_2$ (glutaraldéhyde). Ainsi, dans le procédé, les IgG déposées sur le support solide obtenu à l'étape a) sont adsorbées soit sous forme d'IgG polyvalentes mises en solution après lyophilisation ou d'IgG polyvalentes sous forme liquide, soit sous forme de fractions intermédiaires obtenues au cours d'un procédé de fabrication d'IgG polyvalentes en tampon phosphate comprenant du NaCl dont la concentration peut varier de 0 M à 3 M.

L'élution des IgG retenues à l'étape b) est effectuée avec un tampon d'ions dissociant la liaison entre les IgG et le DNP, sélectionnés notamment parmi les chaotropes tels que la glycine-HCl ou l'iodure de sodium (NaI), dans des conditions faisant varier le pH et/ou la molarité du tampon.

L'étape d) comprend un test ELISA effectué sur un panel d'autoantigènes sélectionnés notamment parmi l'ADN, l'actine, la myosine, la MPB et la tubuline ou tout autre antigène du soi. Cette étape peut également comprendre une mesure de la réactivité pour un antigène vaccinal, par exemple l'anatoxine tétanique, en prenant le taux d'enrichissement par rapport à l'activité des Ig polyvalentes initiales comme valeur contrôle.

On sélectionne ensuite à l'étape e) des sous-populations possédant les propriétés évoquées ci-dessus, c'est à dire des sous-populations induisant la surexpression de l'ARNm et de la protéine IL-1Ra par les macrophages ou les monocytes. On considère qu'il y a surexpression lors que l'on détecte une augmentation significative de l'expression comparée à l'expression de base observée naturellement dans les macrophages ou les monocytes (par exemple une augmentation supérieure à 50% ou plus (par exemple 100 % ou 200 %).

L'invention porte également sur les sous-populations susceptibles d'être obtenues à partir de ce procédé.

L'invention se rapporte également à un procédé de préparation d'anticorps monoclonaux définis ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) transformation des lymphocytes B provenant du sang de donneur sain par l'EBV,
b) identification de clones dans chaque puits de culture sécrétant des IgG capables de reconnaître l'haptène DNP et au moins un autoantigène donné par un test ELISA,
c) amplification des clones identifiés à l'étape b),
d) purification des anticorps produits par les clones de l'étape c) et,
e) sélection des anticorps monoclonaux induisant la surexpression de l'IL-1Ra par les macrophages ou les monocytes humains.

Pour améliorer la stabilité de l'expression des Ig naturelles, les clones identifiés à l'étape b) peuvent être fusionnés avec un myélome non sécréteur d'Ig.

Dans ce procédé, l'autoantigène peut être sélectionné parmi l'ADN, l'actine, la myosine, la protéine basique de la myéline (MBP) et la tubuline.

Dans un autre aspect, l'invention vise les clones de cellules B transformées par EBV sélectionnés, fusionnés ou non avec un myélome et amplifiés par le procédé mentionné ci-dessus. Ces clones se caractérisent en ce qu'ils produisent des anticorps monoclonaux naturels et capables d'induire la surexpression de l'IL-1Ra par les macrophages ou les monocytes.

L'invention a également trait aux anticorps monoclonaux obtenus par lesdits clones. De tels anticorps sont capables d'induire la surexpression de l'IL-1Ra par les macrophages ou les monocytes.

Dans un mode supplémentaire de réalisation, l'invention porte sur une composition comprenant un anticorps naturel défini ci-dessus (sous-population d'anticorps ou anticorps monoclonal) et un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Avantageusement, cette composition est adaptée à une administration par voie intraveineuse, subcutanée ou intramusculaire.

L'invention vise également l'utilisation d'un anticorps naturel mentionné ci-dessus pour la préparation d'un médicament. De préférence, ce médicament est destiné au traitement et à la prévention des maladies inflammatoires. Il peut être utile pour le traitement et la prévention de la septicémie et des chocs septiques, pour le traitement et la prévention de l'arthrite, de l'arthrite rhumatoïde, de la polyarthrite, de l'ostéoporose, des maladies inflammatoires de l'intestin, des maladies autoimmunes, des rejets de greffes, des ischémies, des traumatismes, notamment des traumatismes du cerveau, du psoriasis, des dermatoses, des resténoses, des maladies respiratoires, des rhinites allergiques, des allergies et du cancer.

Légendes

Figure 1 : Capacité inhibitrice de TEGELINE® et de la fraction anti-DNP sur la prolifération de lymphocytes humains stimulés en culture lymphocytaire mixte (CLM).

Figure 2 A-B-C : Effet de TEGELINE® et de la fraction anti-DNP sur la production de cytokines par les PBL humains stimulés en CML.

Figure 3 : Sécrétion d'IL1Ra par des macrophages de souris in vitro.

Figure 4 : Production d'IL-1Ra par les cellules THP1 stimulées par différentes doses de TEGELINE® ou de la fraction anti-DNP.

Figure 5 : Capacité inhibitrice de TEGELINE® et d'anticorps monoclonaux anti-D sur la prolifération de lymphocytes humains stimulés en CML.

Figure 6 A-B : Effet de TEGELINE®et d'anticorps monoclonaux anti-D sur la production de cytokines par des PBL humains stimulés en CML.

Figure 7 : Production d'IL-1ra par les cellules THPA stimulées par différentes doses (25, 50, 100 µg/ml) d'anticorps monoclonaux anti-D

Anticorps monoclonaux	Anti-DNP
D 41 / 96	(+++)
D 32 / 97	(+)
D 35 / 97	(-)
D 83 / 97	(-)

Figure 8 : Dosage de l'IL-1ra en ELISA dans le surnageant de culture de cellules THP1 stimulées par 25 µg/ml de TEGELINE® ou par IgG provenant de cultures de cellules B EBV+ C1 (DNP++) ou C2 (DNP-)

Exemple 1 : Obtention d'une fraction d'IgG anti-DNP à partir d'immunoglobulines polyclonales issues d'un pool de plasma provenant de donneurs sains, (IVIg).

Il a été montré précédemment (FR 99/16632) que le passage sur un immunoadsorbant NHS-Affiprep couplé au DNP-Lysine d'une préparation d'IVIg (TEGELINE®, LFB) permet d'obtenir par élution avec de l'iodure de sodium (NaI), un éluat représentant 0.13% des IgG déposées. Cet éluat possède une forte réactivité en ELISA pour le DNP-albumine et pour de nombreux auto antigènes tels que l'actine, la myosine, le MBP, l'ADN et la tubuline mais pas l'anatoxine tétanique (tableau 1).

Tableau 1 : Réactivité en ELISA de la fraction anti-DNP par rapport à TEGELINE® vis-à-vis de plusieurs antigènes

Taux d'enrichissement de la fraction anti-DNP par rapport à TEGELINE®							
Ana. Téta.	F(ab')2	DNP	Actine	Myosine	MBP	ADN	Tubuline
4,8 ± 2,2	4,5 ± 1,3	235 ± 100	158 ± 64	110 ± 33	94 ± 66	26.0 ± 17	238 ± 108

Cette fraction anti-DNP est capable d'inhiber dix à vingt fois plus que les IgG de départ (TEGELINE®) la prolifération de deux suspensions de PBL humains incompatibles en CML (figure 1).

L'analyse en ELISA de la présence de plusieurs cytokines dans le surnageant des CML montrent que la sécrétion d'IFNg, d'IL-4, d'IL-10, de TNFa et de TGFb est plus fortement inhibée par la fraction anti-DNP que par TEGELINE®. En revanche, la fraction anti-DNP stimule très fortement la synthèse d'IL-1Ra (figures 2).
L'incubation de 2 x 10^6 de macrophages péritonéaux de souris *in vitro* avec la fraction anti-DNP pendant 24h, 48h et 72h provoque la libération d'IL-1Ra de souris ; par contre, l'incubation avec TEGELINE® n'a aucun effet (figure 3).

La mesure de la quantité des ARNm de l'IL-1Ra dans les cellules THP1 (lignées de cellules monocytaires humaines) a été réalisée par PCR quantitative. Le niveau d'expression de l'ARNm de l'IL-1Ra par rapport au niveau d'expression de l'ARNm de l'actine est très augmenté après incubation des cellules THP1 en présence de la fraction anti DNP mais pas de TEGELINE® (tableau 2). L'expression de l'ARNm de TNFα est également augmentée en présence de la fraction mais dans une moins moindre mesure.

Tableau 2 : Effet de TEGELINE® et de la fraction anti-DNP sur la synthèse de l'ARNm du TNFα et de l'IL-1Ra par la cellule THP1.

Echantillons (dosage par RT-PCR quantitative)	ARNm TNFα / ARNm β actine	ARNm IL-1RA /ARNm β actine
Cellules THP1	4	2
Cellules THP1 (+ TEGELINE® 50 µg/ml)	1	9
Cellules THP1 (+ fraction anti-DNP 50 µg/ml)	21	148

De même, le surnageant des cellules THP1 stimulées par la fraction anti-DNP contient d'importante quantité d'IL1-Ra alors qu'aux mêmes concentrations, TEGELINE® n'induit aucune production de cette cytokine (figure 4).

Des expériences précédentes (brevet n° 99 16632) avaient démontré que cette fraction anti-DNP administrée in vivo protégeait contre le développement de la polyarthrite induite par le collagène, de l'encéphalomyélite expérimentale auto immune (EAE) induite par la MBP chez le rat et du diabète chez la souris NOD.

Cette activité protectrice est supérieure après injection des IgG anti-DNP par rapport aux IgIV non-fractionnées. Ces anticorps naturels pourraient représenter un traitement efficace de certaines pathologies inflammatoires.

Exemple 2 : Obtention d'anticorps humains monoclonaux naturels ayant la propriété de stimuler la production d'IL1-Ra.

Exemple 2.1 : Production d'anticorps monoclonaux à partir de lymphocytes du sang périphérique humain provenant d'un donneur immunisé.

Une série d'anticorps monoclonaux humains (Acm) ont été obtenus après transformation par le virus EBV de lymphocytes B provenant du sang de donneurs immunisés par des globules rouges Rh+. Ces anticorps sont tous de type IgG 1 et ont la propriété d'agglutiner les globules rouges Rh+. Ils sont donc spécifiques de l'antigène D.

Quatorze Acm anti-D ont été testés pour leur capacité à reconnaître en ELISA l'haptène DNP et les autoantigènes décrits ci-dessus.

Sur les quatorze Acm, seuls deux Acm D41 et D32 reconnaissent le DNP mais seul D41 se lie aux autoantigènes mais pas à l'anatoxine tétanique. Les autres Acm ne reconnaissent aucun des antigènes de manière supérieure à TEGELINE® (tableau 3).

Tableau 3 : Réactivité en ELISA des anticorps monoclonaux anti-D par rapport à TEGELINE® vis-à-vis de plusieurs antigènes.

Echan-tillons	Taux d'enrichissement de l'activité par rapport à TEGELINE®							
	Anatoxine	DNP-Alb	DNA	F(ab)' 2	Actine	Myosine	MBP	Tubuline
D16/96 P1	< 0,1	2,7	4	< 0,1	1,86	< 0,1	< 0,1	< 0,1
D39/96 P4	< 0,1	3,52	0	< 0,1	1,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1
D12/96 P5	< 0,1	2,28	0	< 0,1	3,1	< 0,1	< 0,1	1,69
D12/96 P7	< 0,1	1,06	0	< 0,1	1,75	< 0,1	< 0,1	< 0,1
D41/96P6/1	< 0,1	**213**	**400**	< 0,1	**119**	< 0,1	< 0,1	**133**
D32/97 P1	< 0,1	**154**	3,4	< 0,1	2,36	< 0,1	< 0,1	< 0,1
D49/97 P3	< 0,1	0,38	0,04	< 0,1	0,43	< 0,1	< 0,1	< 0,1
D35/97 P3	< 0,1	0,03	0	< 0,1	0,08	< 0,1	< 0,1	< 0,1
D83/97 P4	< 0,1	0,29	0	< 0,1	0,09	< 0,1	0,06	< 0,1
Df5/97 P6	< 0,1	0,19	0	< 0,1	0,17	< 0,1	0,36	< 0,1
D83/97 P7	< 0,1	3,45	0	< 0,1	0,24	< 0,1	0,51	< 0,1
D31/97 P8	< 0,1	4,15	2,75	< 0,1	3	< 0,1	0,71	2,18
Pf210	0.16	8,8	8,4	NT	2,8	2,5	0,15	6,1

La capacité des Acm anti-D à inhiber la prolifération de lymphocytes humains incompatibles en CML est supérieure à celle de TEGELINE® pour tous les anticorps qu'ils réagissent avec le DNP ou non (figure 5).

L'étude de la libération de cytokines dans le surnageant des CML montrent que, seuls les deux Acm D41 et D32 réagissant avec le DNP, provoquent une synthèse accrue d'IL-1Ra proportionnellement à leur réactivité au DNP (figure 6). La synthèse d'autres cytokines est soit diminuée (IL-4) soit non modifiée (INFg et TNFa) par les Acm quelle que soit leur réactivité (figures 6).

Le surnageant des cellules THP1 stimulées par l'Acm D41 et D32 contient d'importante quantité d'IL1-Ra alors qu'aux mêmes concentrations, l'Acm D35 et D83 n'induisent qu'une faible production de cette cytokine (figure 7).

Exemple 2.2 : Production d'anticorps monoclonaux à partir de lymphocytes du sang périphérique humain provenant d'un donneur sain.

Des lymphocytes B provenant du sang de donneurs sains ont été transformés par l'EBV et mis en culture à raison de 10^5 cellules par puits. Les surnageants des puits ont été testés pour la présence d'IgG capables de reconnaître en ELISA l'haptène DNP et l'actine. Les quatre puits les plus positifs ont été poolés (C1) et clonés par dilution à 1000, 100, 50 et 10 cellules par puits. La même approche a été utilisée pour sélectionner des puits négatifs en activité anti-DNP et actine (C2) (Tableau 4).

Tableau 4 : Réactivité en ELISA d'IgG purifiées provenant de surnageants de culture de cellules humaines B EBV+ vis-à-vis de plusieurs antigènes.

Echantillons	Taux d'enrichissement de l'activité par rapport à TEGELINE®						
	Anatoxine	DNP-Alb	F(ab)'2	Actine	Myosine	MBP	Tubuline
Préparation1 C1	1,2	40	6,1	16	126	27	56
Préparation2	5,8	115	19	96	392	276	212
Préparation1 C2	0	0,9	0	1,1	0	0	0
Préparation2	0,2	3,9	0,1	6,2	5	1,4	5,1

Les cellules des puits C1 et C2 ont été amplifiées pour obtenir des quantités d'anticorps suffisantes pour être purifiés sur protéine G. Les anticorps obtenus sont de type IgG et le tableau 4 présentent les résultats de deux purifications réalisées à partir de surnageants prélevés à J+7 (préparation 1) et J+14 (préparation 2) et montrent que les IgG purifiées du puits C1 reconnaissent le DNP et sont réactives pour un certain nombre d'autoantigènes. Par contre, les IgG du puits C2 ne possèdent aucune activité enrichie par rapport à TEGELINE®.

Les IgG purifiées à partir des deux puits C1 et C2 ont été incubées à la dose de 25 µg/ml en présence de cellules THP1. La croissance cellulaire est inhibée en présence des IgG de C1 mais pas de C2 (données non présentées) et seules les IgG de C1 stimulent la production in vitro d'IL-1Ra par les cellules THP1 (figure 8).

Les cellules des puits C1 et C2 sont en cours de clonage à 0.5 cellules par puits pour obtenir des IgG monoclonales.

Tous ces résultats montrent une corrélation positive entre la réactivité d'anticorps de type IgG vis-à-vis de plusieurs autoantigènes et la capacité accrue d'induire la synthèse d'IL-1Ra qu'ils soient polyclonaux ou monoclonaux par des monocytes ou des macrophages.

REVENDICATIONS

1. Anticorps monoclonal de classe IgG réagissant avec l'haptène DNP et au moins un autoantigène sélectionné parmi la myosine, l'actine, la protéine basique de la myéline (MBP) et la tubuline, caractérisé en ce qu'il induit une surexpression de l'IL-1Ra dans les macrophages ou les monocytes.

2. Anticorps selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il ne réagit pas avec l'anatoxine tétanique.

3. Anticorps selon l'une des revendications 1 et 2 ayant un taux de réactivité vis-à-vis de l'haptène DNP supérieur à 100 par rapport aux IgIV, notamment par rapport à TEGELINE®.

4. Anticorps selon l'une des revendications 1 à 3 ayant un taux de réactivité vis-à-vis d'au moins un autoantigène sélectionné parmi la myosine, l'actine, le MBP et la tubuline supérieur à 50 par rapport aux IgIV polyvalentes, notamment par rapport à TEGELINE®.

5. Procédé de préparation d'anticorps monoclonaux définis aux revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) transformation des lymphocytes B provenant du sang de donneur sain par l'EBV,

b) identification de clones dans chaque puits de culture sécrétant des IgG capables de reconnaître l'haptène DNP et au moins un autoantigène donné par un test ELISA,

c) amplification des clones identifiés à l'étape b),

d) purification des anticorps produits par les clones de l'étape c) et,

sélection des anticorps monoclonaux induisant la surexpression de l'IL-1Ra par les macrophages ou les monocytes humains.

6. Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que l'autoantigène est sélectionné parmi l'ADN, l'actine, la myosine, la protéine basique de la myéline (MBP) et la tubuline.

7. Procédé selon l'une des revendications 5 et 6 caractérisé en ce que les clones identifiés à l'étape b) sont fusionnés avec un myélome non sécréteur d'Ig.

8. Anticorps monoclonal susceptible d'être obtenus à partir du procédé selon l'une des revendications 5 à 7 caractérisé en ce qu'il est capable d'induire la surexpression de l'IL-1Ra par les macrophages ou les monocytes.

9. Clones de lymphocytes B EBV identifiés et amplifiés par le procédé selon l'une des revendications 5 à 7 caractérisés en ce qu'ils produisent des anticorps monoclonaux capables d'induire la surexpression de l'IL-1Ra par les macrophages ou les monocytes.

10. Anticorps monoclonal obtenu par un clone selon la revendication 9 caractérisé en ce qu'il est capable d'induire la surexpression de l'IL-1Ra par les macrophages ou les monocytes.

11. Composition comprenant un anticorps selon l'une des revendications 1 à 4, 8 et 10 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

12. Composition selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est adaptée à une administration par voie intraveineuse, subcutanée ou intramusculaire.

13. Procédé de préparation d'une sous-population d'IgG caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) préparation d'un support insoluble sur lequel est greffé du DNP-lysine,
b) adsorption d'Ig polyvalentes sur le support obtenu à l'étape a),
c) élution des Ig retenues sur la partie DNP liée au support de façon à recueillir la fraction interagissant avec le DNP,

d) sélection des fractions présentant une réactivité vis-à-vis d'autoantigènes donnés, et

e) sélection des fractions induisant la surexpression de l'IL-1Ra par les macrophages ou les monocytes au niveau de l'ARNm et de la protéine sécrétée.

14. Procédé selon la revendication 13 caractérisé en ce que l'étape d) comprend une mesure de la réactivité pour l'anatoxine tétanique en prenant le taux d'enrichissement par rapport à l'activité des Ig polyvalentes initiales comme valeur contrôle.

15. Procédé selon l'une des revendications 13 et 14 caractérisé en ce que l'étape d) comprend un test ELISA effectué sur un panel d'autoantigènes sélectionnés notamment parmi l'ADN, l'actine, la myosine, la protéine basique de la myéline (MBP) et la tubuline.

16. Procédé selon l'une des revendications 13 à 15 caractérisé en ce que les Ig déposées sur le support solide obtenu à l'étape a) sont adsorbées soit sous forme d'IgG polyvalentes lyophilisées et remises en solution ou sous forme liquide, soit sous forme de fractions intermédiaires obtenues au cours d'un procédé de fabrication d'IgG polyvalentes en tampon phosphate comprenant du NaCl dont la concentration peut varier de 0 M à 3 M.

17. Utilisation d'une sous-population d'IgG susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une des revendication 13 à 16 pour la fabrication d'un médicament pour induire une surexpression de l'IL-1Ra dans les macrophages ou les monocytes.

18. Utilisation selon la revendication 17 caractérisée en ce que la sous-population d'IgG est préparée à partir d'Ig polyvalentes ou toute autre fraction intermédiaire obtenue au cours du procédé de fabrication des IgIV à usage thérapeutique.

19. Utilisation d'un anticorps monoclonal selon l'une des revendications 1 à 4, 8 et 10, pour la préparation d'un médicament.

20. Utilisation selon la revendication 19 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement et la prévention des maladies inflammatoires.

21. Utilisation selon la revendication 19 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement et la prévention de la septicémie et des chocs septiques.

22. Utilisation selon la revendication 19 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement et la prévention de l'arthrite, de l'arthrite rhumatoïde, de la polyarthrite, de l'ostéoporose, des maladies inflammatoires de l'intestin, des maladies autoimmunes, des rejets de greffes, des ischémies, des traumatismes, notamment des traumatismes du cerveau, du psoriasis, des dermatoses, des resténoses, des maladies respiratoires, des rhinites allergiques, des allergies et du cancer.

23. Utilisation selon la revendication 17 ou 18 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement et la prévention des maladies inflammatoires, de la septicémie et des chocs septiques, de l'arthrite, de l'arthrite rhumatoïde, de la polyarthrite, de l'ostéoporose, des maladies inflammatoires de l'intestin, des ischémies, des traumatismes, notamment des traumatismes du cerveau, du psoriasis, des dermatoses, des resténoses, des maladies respiratoires, des rhinites allergiques, des allergies et du cancer.

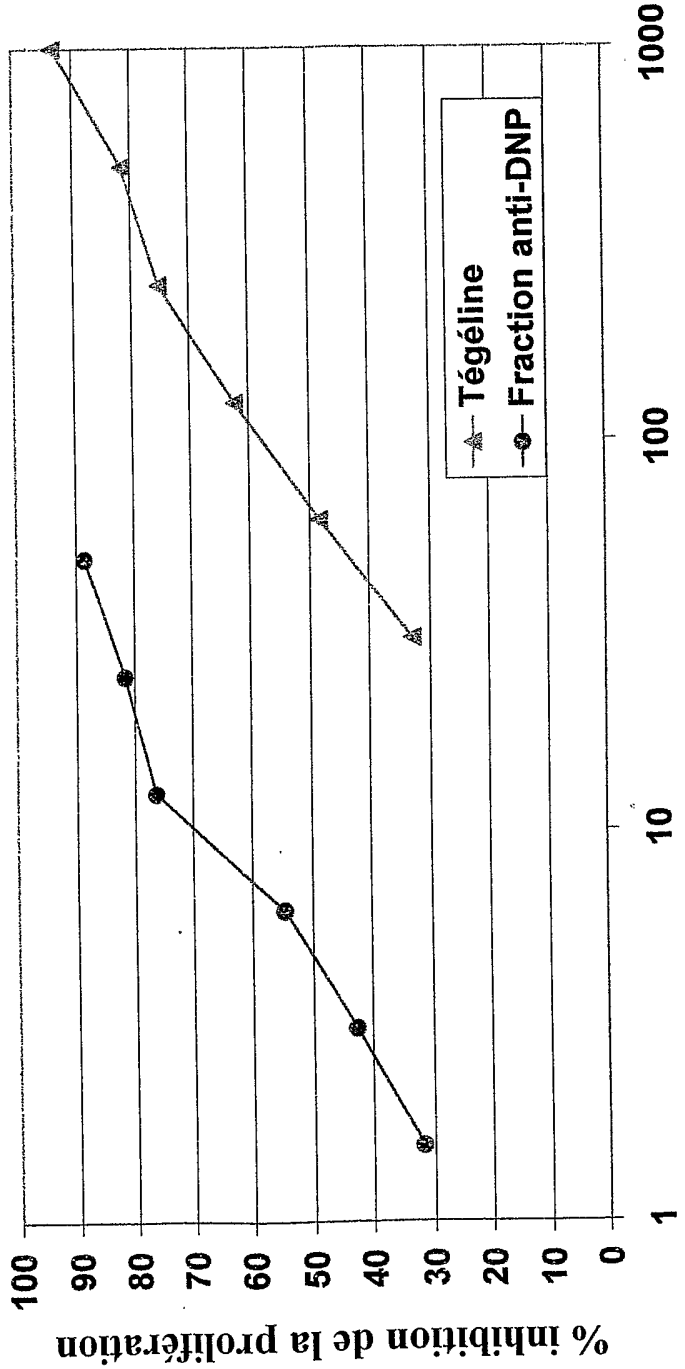

% inhibition de la prolifération
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1
10
100
1000
Concentration (µg/ml)
Tégéline
Fraction anti-DNP

FIGURE 1

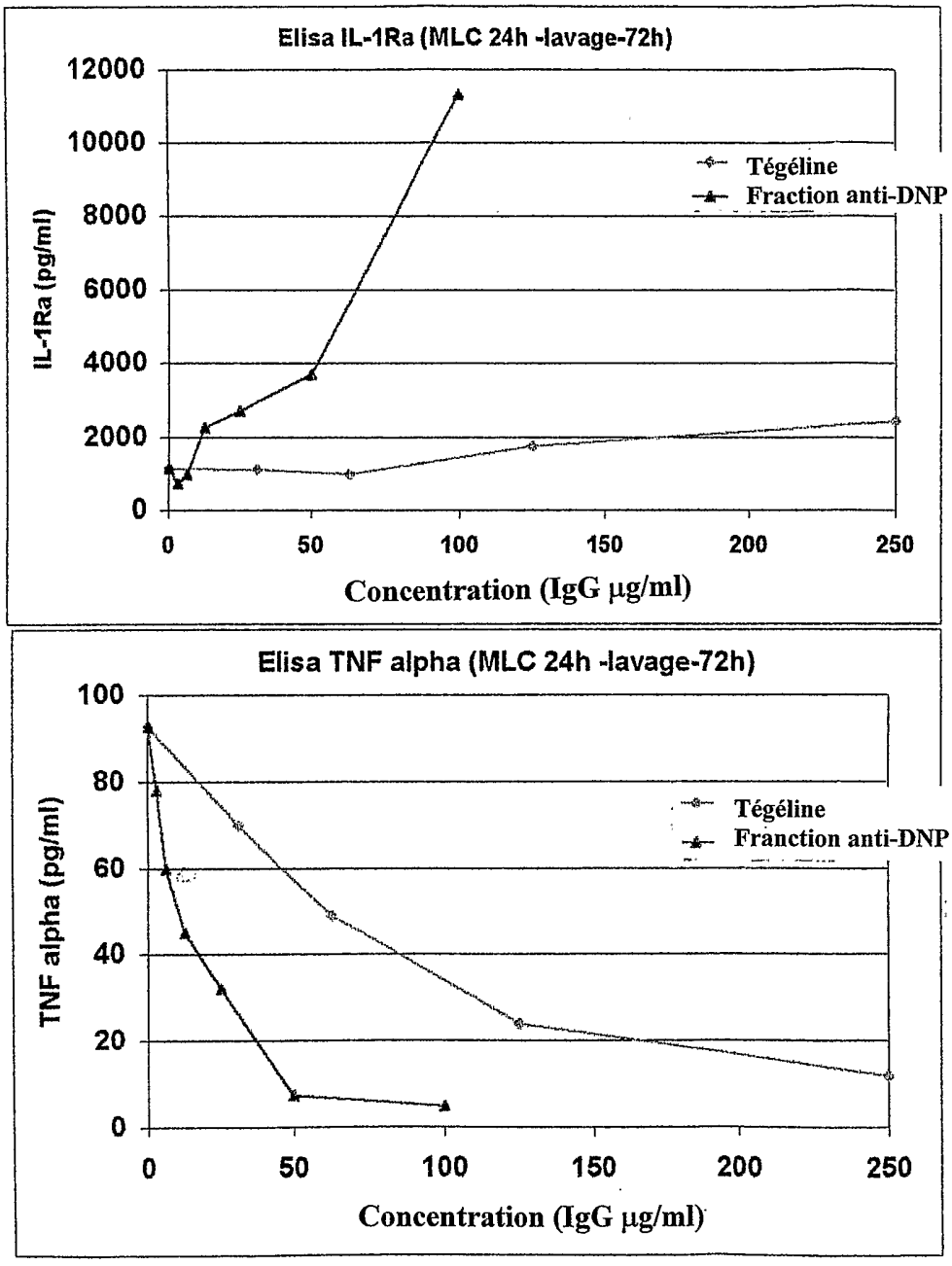

Elisa IL-1Ra (MLC 24h -lavage-72h)
IL-1Ra (pg/ml)
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
50
100
150
200
250
Concentration (IgG µg/ml)
Tégéline
Fraction anti-DNP
Elisa TNF alpha (MLC 24h -lavage-72h)
TNF alpha (pg/ml)
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
200
250
Concentration (IgG µg/ml)
Tégéline
Franction anti-DNP

FIGURE 2A

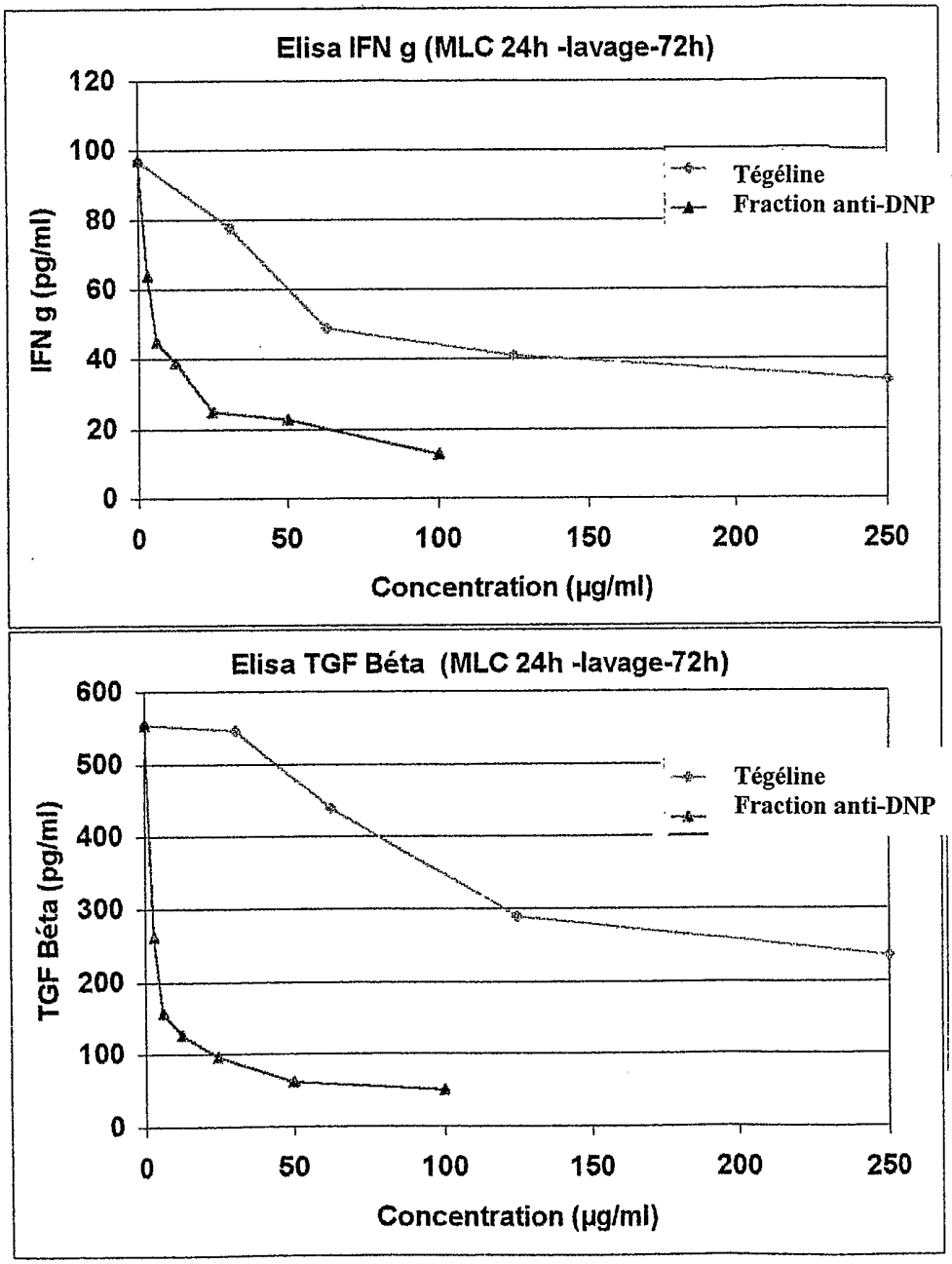

Elisa IFN g (MLC 24h -lavage-72h)
IFN g (pg/ml)
120
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
200
250
Concentration (µg/ml)
Tégéline
Fraction anti-DNP
Elisa TGF Béta (MLC 24h -lavage-72h)
TGF Béta (pg/ml)
600
500
400
300
200
100
0
0
50
100
150
200
250
Concentration (µg/ml)
Tégéline
Fraction anti-DNP

FIGURE 2B

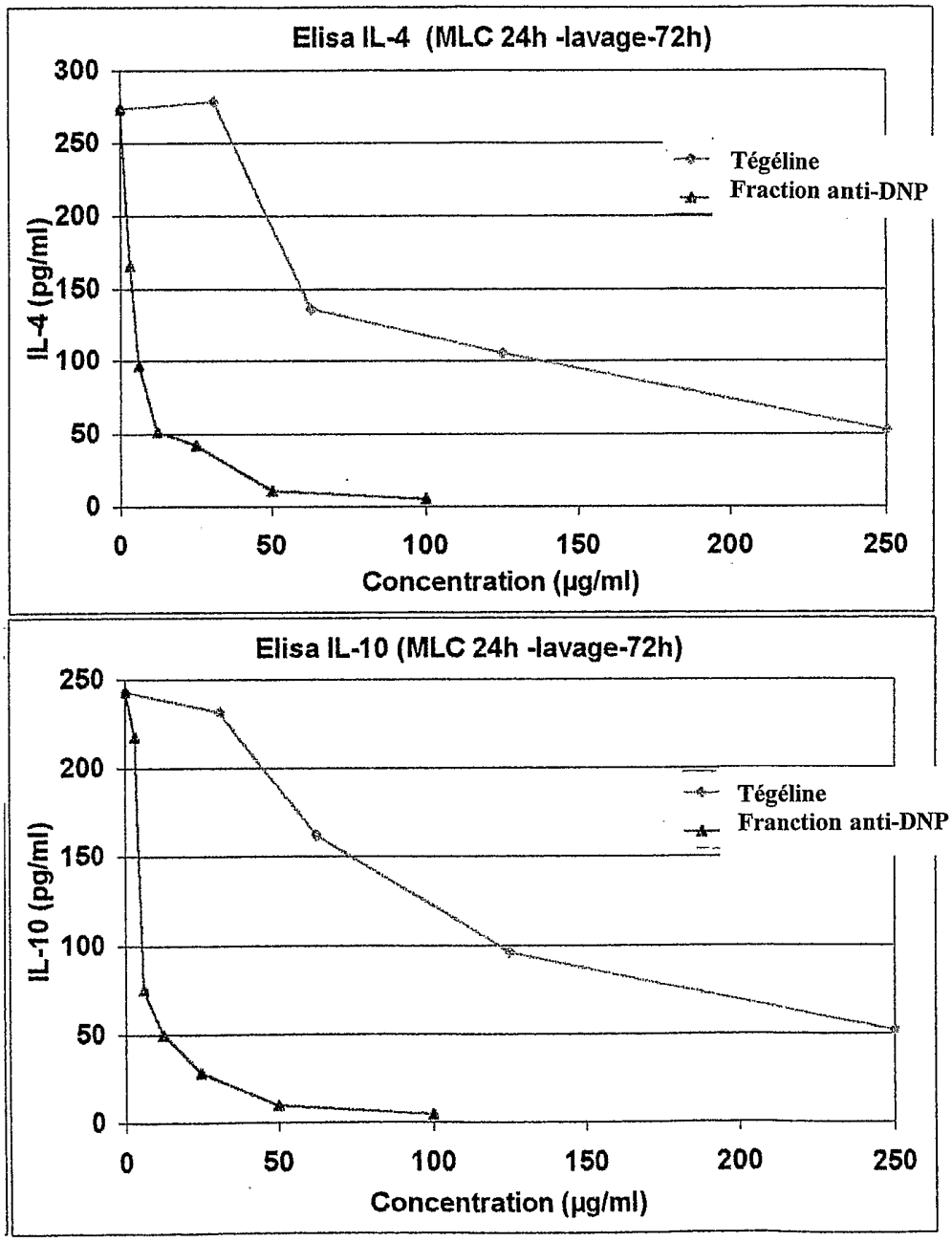

Elisa IL-4 (MLC 24h -lavage-72h)
IL-4 (pg/ml)
300
250
200
150
100
50
0
0
50
100
150
200
250
Concentration (µg/ml)
Tégéline
Fraction anti-DNP
Elisa IL-10 (MLC 24h -lavage-72h)
IL-10 (pg/ml)
250
200
150
100
50
0
0
50
100
150
200
250
Concentration (µg/ml)
Tégéline
Franction anti-DNP

FIGURE 2C

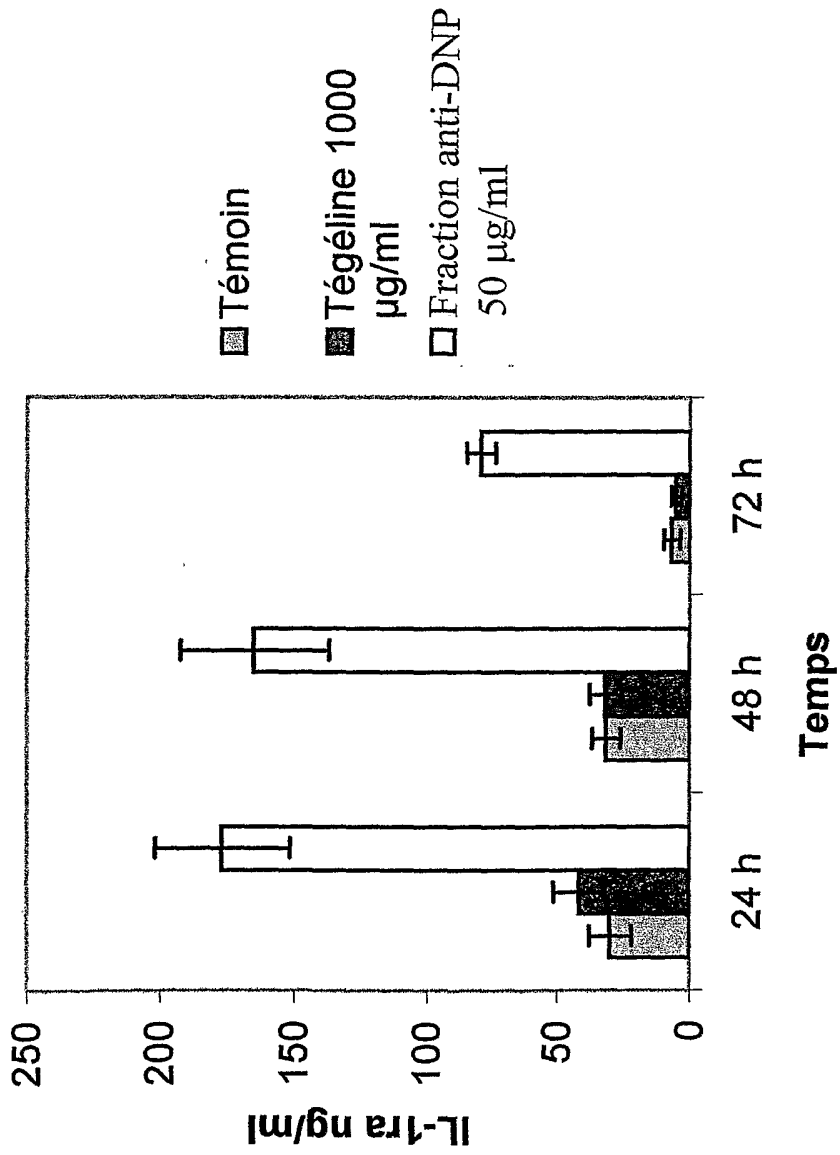

Témoin
Tégéline 1000 µg/ml
Fraction anti-DNP 50 µg/ml
IL-1ra ng/ml
250
200
150
100
50
0
24 h
48 h
72 h
Temps

FIGURE 3

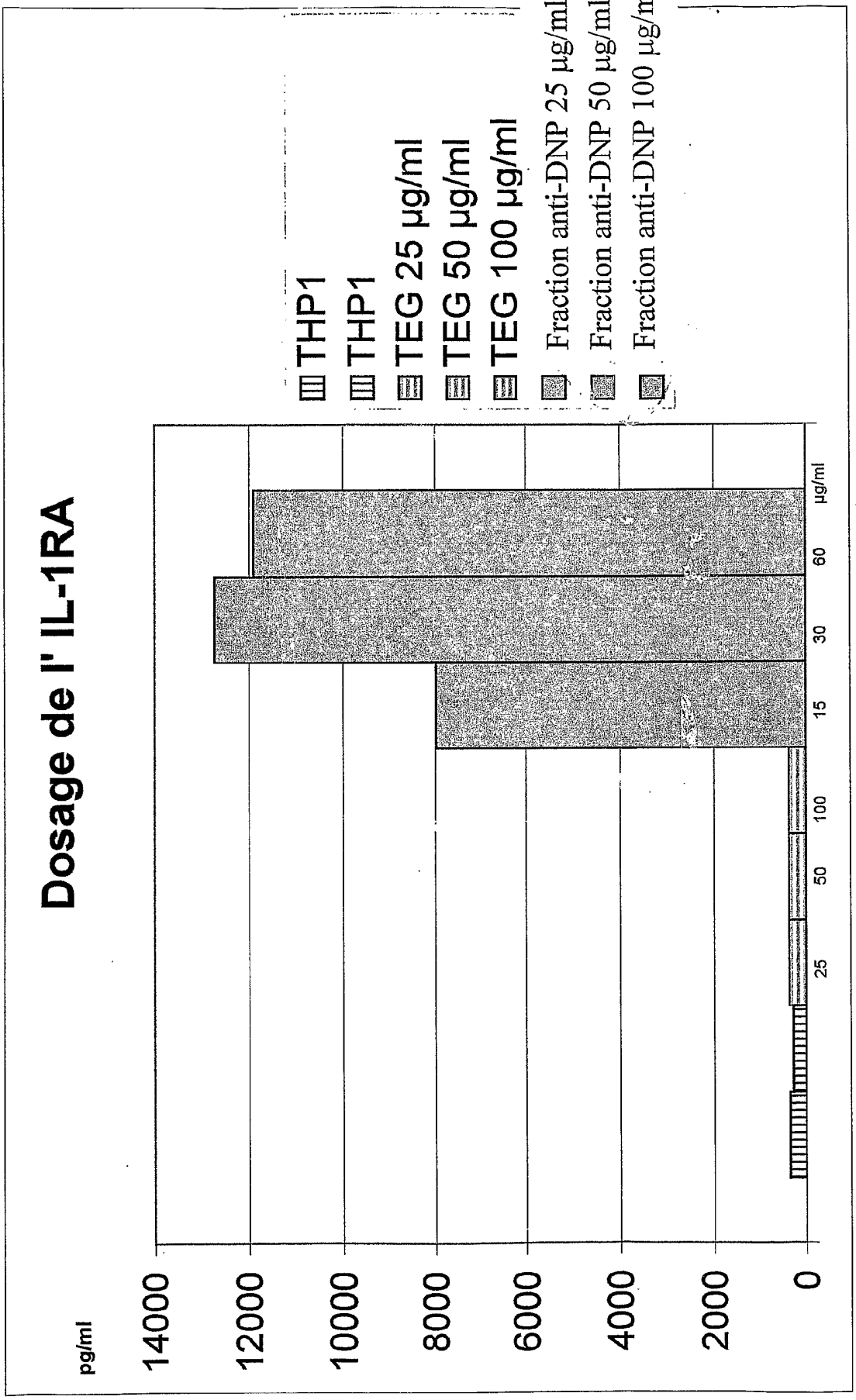

Dosage de l' IL-1RA
pg/ml
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
THP1
THP1
TEG 25 µg/ml
TEG 50 µg/ml
TEG 100 µg/ml
Fraction anti-DNP 25 µg/ml
Fraction anti-DNP 50 µg/ml
Fraction anti-DNP 100 µg/ml
25
50
100
15
30
60
µg/ml

FIGURE 4

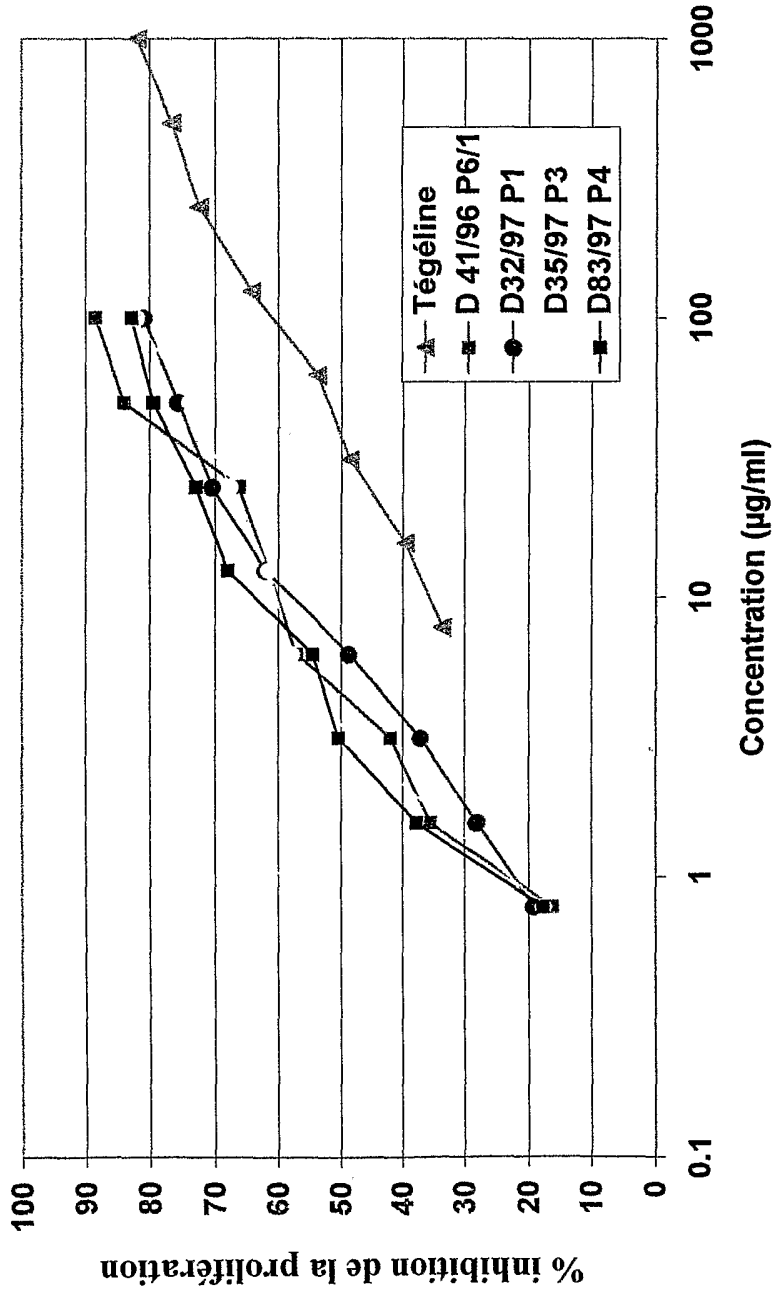

% inhibition de la prolifération
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.1
1
10
100
1000
Concentration (µg/ml)
Tégéline
D 41/96 P6/1
D32/97 P1
D35/97 P3
D83/97 P4

FIGURE 5

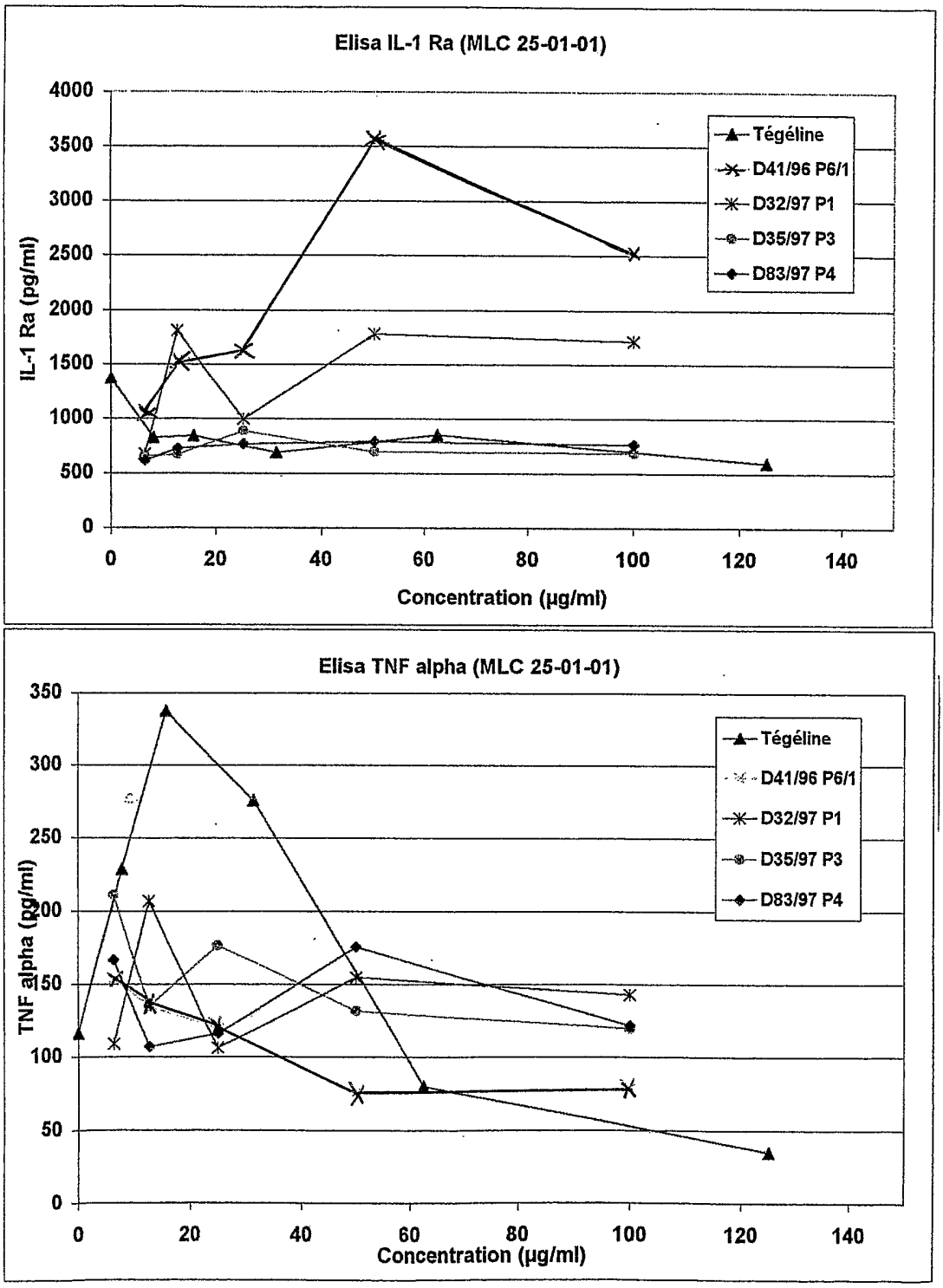

Elisa IL-1 Ra (MLC 25-01-01)
IL-1 Ra (pg/ml)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
20
40
60
80
100
120
140
Concentration (µg/ml)
Tégéline
D41/96 P6/1
D32/97 P1
D35/97 P3
D83/97 P4
Elisa TNF alpha (MLC 25-01-01)
TNF alpha (pg/ml)
350
300
250
200
150
100
50
0
0
20
40
60
80
100
120
140
Concentration (µg/ml)
Tégéline
D41/96 P6/1
D32/97 P1
D35/97 P3
D83/97 P4

FIGURE 6A

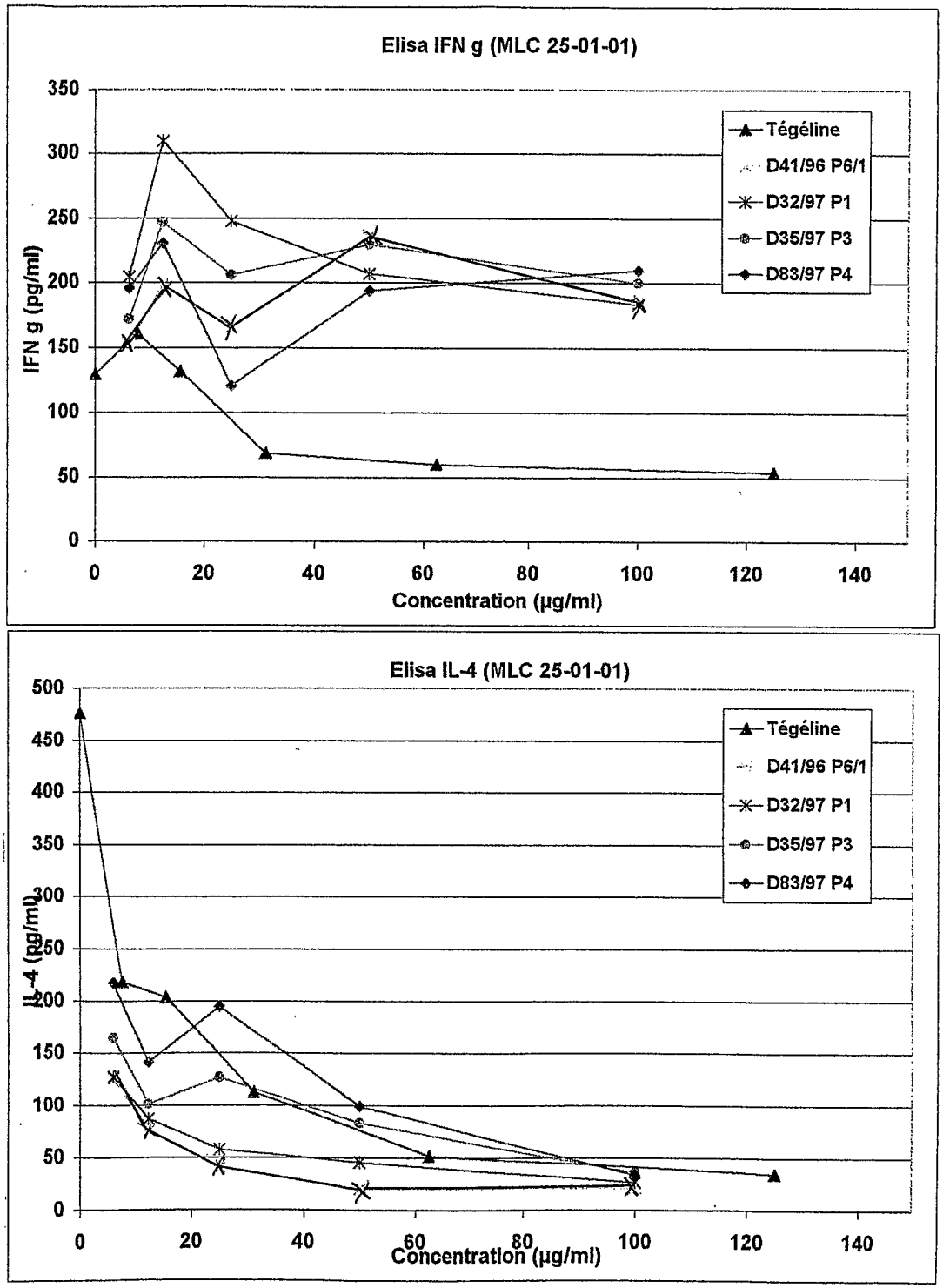

Elisa IFN g (MLC 25-01-01)
IFN g (pg/ml)
Concentration (µg/ml)
Tégéline
D41/96 P6/1
D32/97 P1
D35/97 P3
D83/97 P4
Elisa IL-4 (MLC 25-01-01)
IL-4 (pg/ml)
Concentration (µg/ml)
Tégéline
D41/96 P6/1
D32/97 P1
D35/97 P3
D83/97 P4

FIGURE 6B

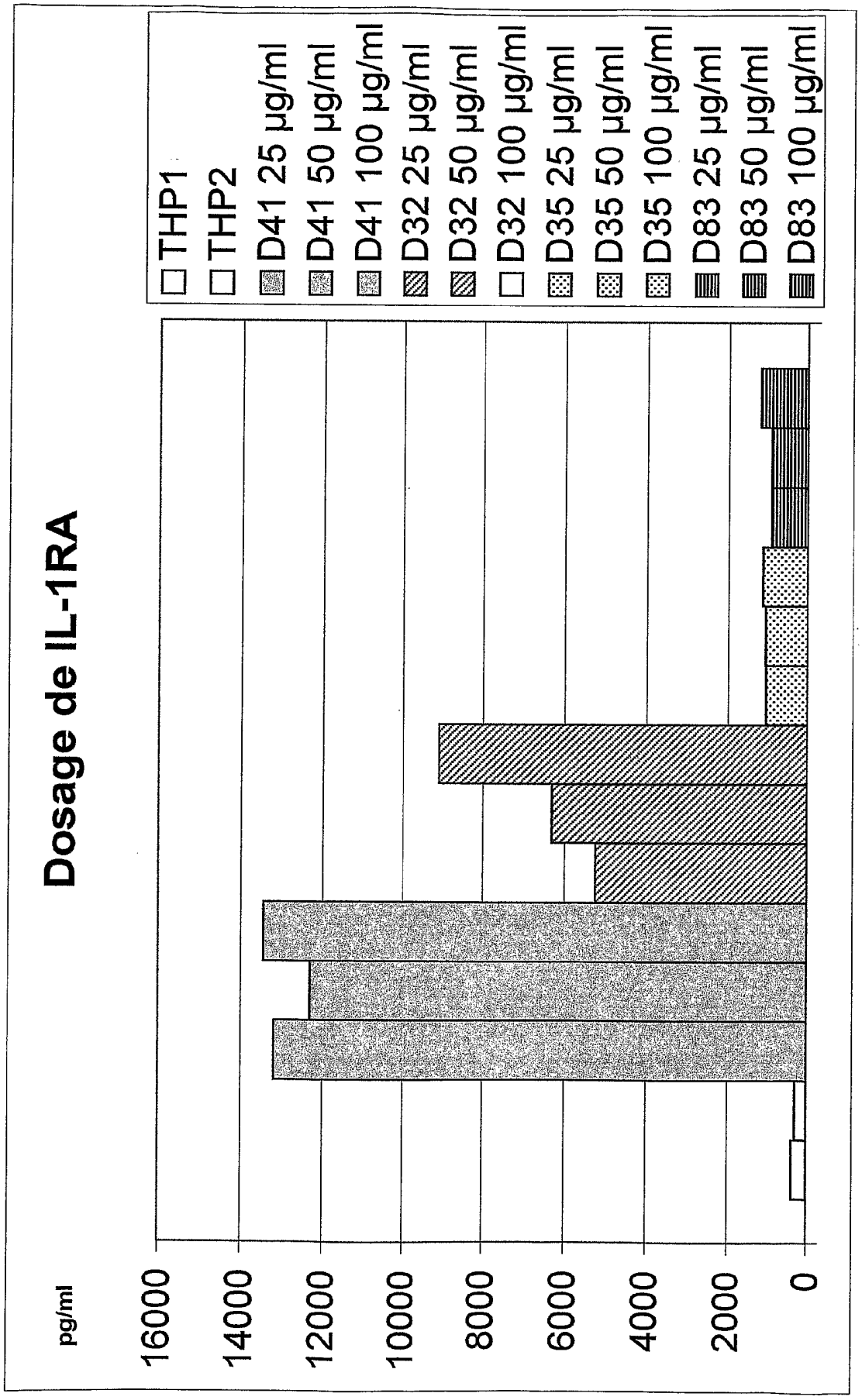

Dosage de IL-1RA
pg/ml
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
THP1
THP2
D41 25 µg/ml
D41 50 µg/ml
D41 100 µg/ml
D32 25 µg/ml
D32 50 µg/ml
D32 100 µg/ml
D35 25 µg/ml
D35 50 µg/ml
D35 100 µg/ml
D83 25 µg/ml
D83 50 µg/ml
D83 100 µg/ml

FIGURE 7

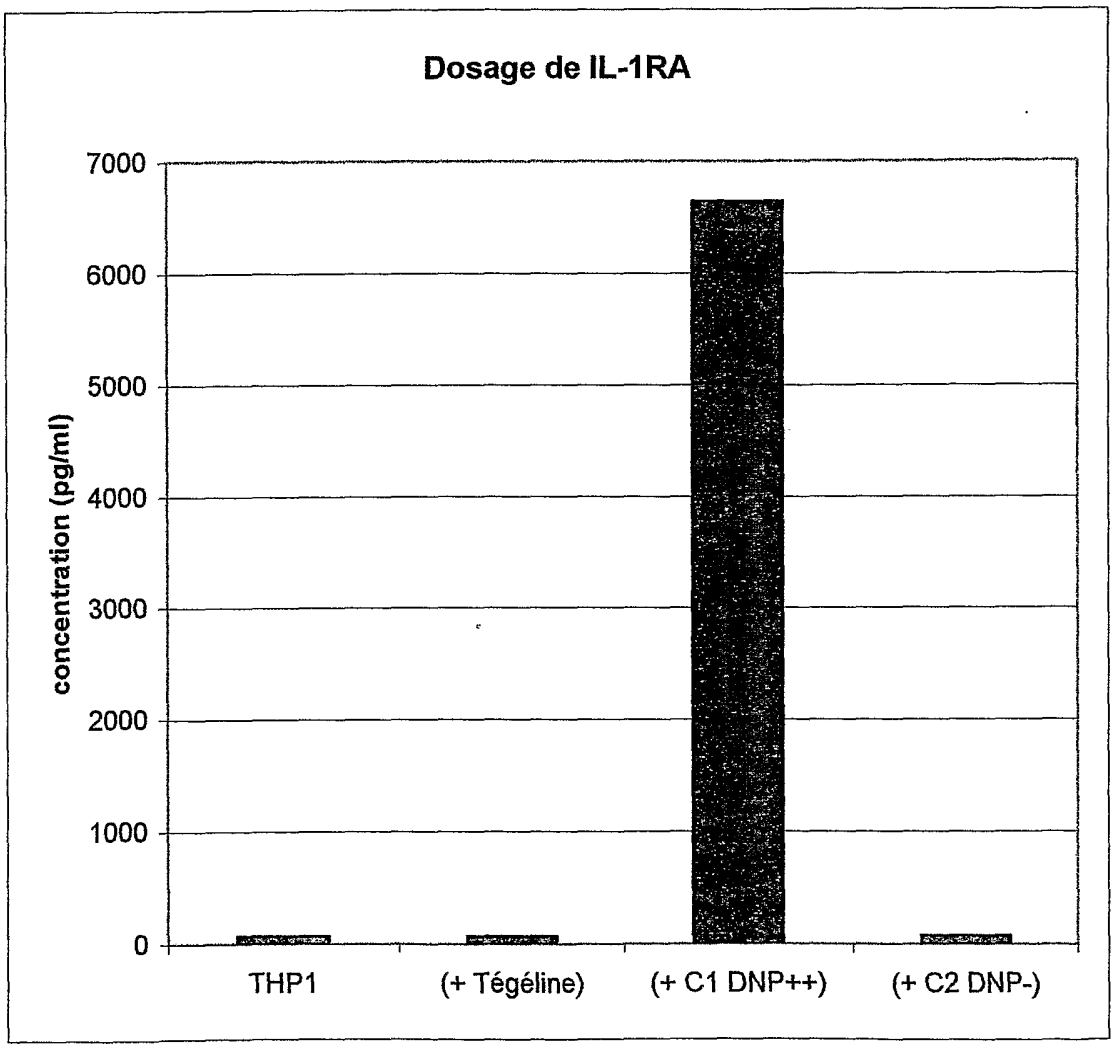

Dosage de IL-1RA
concentration (pg/ml)
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
THP1
(+ Tégéline)
(+ C1 DNP++)
(+ C2 DNP-)

FIGURE 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 02/03854

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K16/44 C07K16/06 A61K39/395 A61P19/02 A61P31/00
A61P37/00

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1 059 088 A (FRACTIONNEMENT ET DE BIOTECHNO) 13 December 2000 (2000-12-13) claims 1-29 ---	1-23
A	TOWBIN H ET AL: "MONOCLONAL ANTIBODY BASED ENZYME-LINKED AND CHEMILUMINESCENT ASSAYS FOR THE HUMAN INTERLEUKIN-1 RECEPTOR ANTAGONIST APPLICATION TO MEASURE HIL-1RA LEVELS IN MONOCYTE CULTURES AND SYNOVIAL FLUIDS" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 170, no. 1, 1994, pages 125-135, XP002038694 ISSN: 0022-1759 the whole document --- -/--	1-23

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11 April 2003	22/04/2003

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Le Flao, K

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 02/03854

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR 2 794 460 A (FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHN) 8 December 2000 (2000-12-08) claims 1-22	1-23
A	AREND W P ET AL: "BIOLOGICAL PROPERTIES OF RECOMBINANT HUMAN MONOCYTE-DERIVED INTERLEUKIN 1 RECEPTOR ANTAGONIST" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, NEW YORK, NY, US, vol. 85, no. 5, 1 May 1990 (1990-05-01), pages 1694-1697, XP002038689 ISSN: 0021-9738 the whole document	1-23
A	DIETRICH G ET AL: "A V REGION-CONNECTED AUTOREATIVE SUBFRACTION OF NORMAL HUMAN SERUM IMMUNOGLOBULIN G*" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WEINHEIM, DE, vol. 22, no. 7, July 1992 (1992-07), pages 1701-1706, XP000877158 ISSN: 0014-2980 the whole document	1-23

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 02/03854

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1059088 A	13-12-2000	FR 2794460 A1	08-12-2000
		FR 2794461 A1	08-12-2000
		AU 5538700 A	28-12-2000
		EP 1059088 A1	13-12-2000
		WO 0074717 A1	14-12-2000
FR 2794460 A	08-12-2000	FR 2794460 A1	08-12-2000
		AU 5538700 A	28-12-2000
		EP 1059088 A1	13-12-2000
		WO 0074717 A1	14-12-2000
		FR 2794461 A1	08-12-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 02/03854

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C07K16/44 C07K16/06 A61K39/395 A61P19/02 A61P31/00
A61P37/00

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

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C07K

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

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 1 059 088 A (FRACTIONNEMENT ET DE BIOTECHNO) 13 décembre 2000 (2000-12-13) revendications 1-29 ---	1-23
A	TOWBIN H ET AL: "MONOCLONAL ANTIBODY BASED ENZYME-LINKED AND CHEMILUMINESCENT ASSAYS FOR THE HUMAN INTERLEUKIN-1 RECEPTOR ANTAGONIST APPLICATION TO MEASURE HIL-1RA LEVELS IN MONOCYTE CULTURES AND SYNOVIAL FLUIDS" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 170, no. 1, 1994, pages 125-135, XP002038694 ISSN: 0022-1759 le document en entier --- -/--	1-23

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

[X] Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
11 avril 2003	22/04/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Le Flao, K

1

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (juillet 1992)

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec,le cas échéant, l'indicationdes passages pertinents	no. des revendications visées
A	FR 2 794 460 A (FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHN) 8 décembre 2000 (2000-12-08) revendications 1-22 ---	1-23
A	AREND W P ET AL: "BIOLOGICAL PROPERTIES OF RECOMBINANT HUMAN MONOCYTE-DERIVED INTERLEUKIN 1 RECEPTOR ANTAGONIST" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, NEW YORK, NY, US, vol. 85, no. 5, 1 mai 1990 (1990-05-01), pages 1694-1697, XP002038689 ISSN: 0021-9738 le document en entier ---	1-23
A	DIETRICH G ET AL: "A V REGION-CONNECTED AUTOREATIVE SUBFRACTION OF NORMAL HUMAN SERUM IMMUNOGLOBULIN G*" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WEINHEIM, DE, vol. 22, no. 7, juillet 1992 (1992-07), pages 1701-1706, XP000877158 ISSN: 0014-2980 le document en entier -----	1-23

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No
PCT/FR 02/03854

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
EP 1059088	A	13-12-2000	FR	2794460 A1	08-12-2000
			FR	2794461 A1	08-12-2000
			AU	5538700 A	28-12-2000
			EP	1059088 A1	13-12-2000
			WO	0074717 A1	14-12-2000
FR 2794460	A	08-12-2000	FR	2794460 A1	08-12-2000
			AU	5538700 A	28-12-2000
			EP	1059088 A1	13-12-2000
			WO	0074717 A1	14-12-2000
			FR	2794461 A1	08-12-2000