

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
4 décembre 2008 (04.12.2008)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2008/145866 A1

(51) Classification internationale des brevets :
A61K 39/395 (2006.01) A61K 35/14 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2008/000598

(22) Date de dépôt international : 25 avril 2008 (25.04.2008)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0703013 25 avril 2007 (25.04.2007) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
LFB BIOTECHNOLOGIES [FR/FR]; 3, avenue des
Tropiques, ZA de Courtaboeuf, F-91940 Les Ulis (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : DE
ROMEUF, Christophe [FR/FR]; 14, avenue Ami-
ral Courbet, F-59120 Lambersart (FR). FOURNIER,
Nathalie [FR/FR]; 26, rue Gabriel Péri, App. 14, F-59700
Marcq en Baroeul (FR). FERNANDEZ, Nadine [FR/FR];
182Bis, avenue de Verdun, F-92130 Issy-les-Moulineaux
(FR).

(74) Mandataires : POCHART, Francois etc.; Cabinet
Hirsch-Pochart et Associés, 58, Avenue Marceau, F-75008
Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL,
PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL,
NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), 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))

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues
- avec une (des) indication(s) relative(s) à du matériel biolo-
gique déposé, fournie(s) selon la règle 13bis, séparément,
et non avec la description
- avec la partie réservée au listage des séquences de la de-
scription publiée séparément sous forme électronique et dis-
ponible sur demande auprès du Bureau international
- avec tous renseignements concernant une requête en res-
tauration du droit de priorité présentée en ce qui concerne
une ou plusieurs revendications de priorité

(54) Title: SET OF MEANS FOR TREATING A MALIGNANT PATHOLOGY, AN AUTOIMMUNE DISEASE OR AN INFEC-
TIOUS DISEASE

(54) Titre : ENSEMBLE DE MOYENS POUR LE TRAITEMENT D'UNE PATHOLOGIE MALIGNNE, D'UNE MALADIE
AUTO- IMMUNE OU D'UNE MALADIE INFECTIEUSE

(57) Abstract: Set of means for treating a malignant pathology, an autoimmune disease or an infectious disease, comprising an
effector cell which expresses the FcγRIII receptor (CD16) at its surface, and a monoclonal antibody, wherein the affinity of the Fc
region of said monoclonal antibody for CD16 is greater than the affinity of the Fc region of polyclonal immunoglobulins for CD16.

(57) Abrégé : Ensemble de moyens pour le traitement d'une pathologie maligne, d'une maladie auto-immune ou d'une maladie
infectieuse, comprenant une cellule effectrice qui exprime le récepteur FcγRIII (CD16) à sa surface, et un anticorps monoclonal,
l'affinité de la région Fc dudit anticorps monoclonal pour le CD16 étant supérieure à l'affinité de la région Fc des immunoglobulines
polyclonales pour CD16.



WO 2008/145866 A1

ENSEMBLE DE MOYENS POUR LE TRAITEMENT D'UNE PATHOLOGIE
MALIGNE, D'UNE MALADIE AUTO-IMMUNE OU D'UNE MALADIE
INFECTIEUSE

5

La présente invention se rapporte de manière générale à un traitement d'une pathologie maligne, d'une maladie auto-immune, ou d'une maladie infectieuse, notamment par le biais d'une cellule effectrice qui exprime un récepteur Fc γ R à sa surface.

10

INTRODUCTION ET ART ANTERIEUR

De plus en plus utilisés en recherche, les anticorps constituent également des outils de choix en diagnostic et en thérapeutique, où ils représentent une alternative aux traitements conventionnels.

De nombreuses préparations d'anticorps à usage thérapeutique, d'origine plasmatique ou issue des biotechnologies, sont actuellement sur le marché, ou en phase de développement clinique. Leurs propriétés sont exploitées pour obtenir des outils thérapeutiques capables de se lier de manière spécifique à leur cible, et de recruter de manière efficace les cellules du système immunitaire.

25

Ces dernières années, la recherche s'est orientée sur l'amélioration de l'efficacité des anticorps, et, plus particulièrement, vers la manipulation de leur région constante Fc. C'est cette dernière qui est responsable des propriétés « effectrices » des anticorps, car elle permet la mobilisation des cellules effectrices du système immunitaire et des protéines du complément. Cette faculté est rendue possible par la présence, sur certaines cellules effectrices, de glycoprotéines i.e. les récepteurs Fc (RfC). Ces récepteurs sont capables de lier la région constante des anticorps, une fois que ces derniers se sont fixés, par leur région variable, sur l'antigène cible. La liaison de la région Fc des anticorps

35

- 2 -

sur les RfC portés par les cellules effectrices induit chez ces dernières l'activation de mécanismes cytotoxiques comme la phagocytose et l'ADCC (cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ou Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity).

5 Lors d'une maladie auto-immune, le système immunitaire, dont le rôle naturel est de protéger l'organisme des agressions, provoque une réponse inflammatoire en l'absence de corps étranger et ainsi induit lui-même des lésions tissulaires en attaquant "par erreur" les molécules du soi. Il existe
10 différentes pathologies auto-immunes qui affectent différents tissus ou différentes fonctions du corps. Par exemple, le cerveau est atteint chez les personnes souffrant de sclérose en plaques, les intestins sont la cible chez les patients atteints de la maladie de Crohn et la synovie, les os et les
15 cartilages sont touchés chez les personnes atteintes de polyarthrite rhumatoïde. Lors du développement de la maladie auto-immune, il peut se produire plusieurs phénomènes comme la destruction progressive d'un ou plusieurs types de tissus, la croissance anormale d'un organe ou des modifications de la ou
20 des fonctions de l'organe atteint. Les tissus ou organes les plus souvent atteints lors d'une maladie auto-immune sont les cellules hématopoïétiques, les vaisseaux sanguins, les tissus connectifs, les glandes endocrines, les muscles, les articulations et la peau. Les maladies auto-immunes sont
25 souvent associées à une pathologie inflammatoire chronique. Le cas le plus fréquent est représenté par la polyarthrite rhumatoïde et l'arthrite rhumatoïde juvénile qui sont deux types d'arthrite inflammatoire. L'arthrite est un terme général qui désigne l'inflammation des articulations.

30 La plupart des traitements présentent de nombreux effets secondaires ou ne préviennent pas complètement la progression de la maladie. Actuellement, il n'existe pas de traitement idéal et aucun ne permet de guérir les patients, ce qui génère un besoin évident pour de nouvelles thérapies plus efficaces
35 et surtout curatives.

Les lymphocytes B (LB) étant les cellules productrices des auto-anticorps souvent responsables du développement de

- 3 -

maladies auto-immunes, leur destruction par administration d'un anticorps monoclonal spécifique de ce type cellulaire ne peut être que bénéfique pour les patients, comme cela a été démontré pour le rituximab qui vient d'être approuvé pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde.

Par ailleurs, malgré les progrès considérables réalisés dans l'amélioration des conditions sanitaires, en immunisation et dans les thérapies anti-microbiennes, les maladies infectieuses représentent un problème persistant et significatif de la médecine moderne. La maladie la plus répandue, le simple rhume est une maladie infectieuse au même titre que le SIDA (Syndrome d'immunodéficience acquise), maladie la plus redoutée. Il a été prouvé que certains désordres neurologiques classés comme maladies dégénératives étaient en fait liés à une infection. Les maladies infectieuses resteront dans le futur un problème médical majeur.

Lors d'une maladie infectieuse, les anticorps monoclonaux peuvent avoir deux rôles complémentaires: un rôle de neutralisation de l'agent pathogène ou des toxines secrétées lors de la phase aiguë de l'infection et un rôle dans la destruction des cellules réservoirs lors du passage à la chronicité. La destruction des cellules de l'hôte permettant la duplication à bas bruit de l'agent pathogène pourrait permettre de prévenir le passage à une phase chronique aboutissant le plus souvent au développement de pathologies graves comme une maladie auto-immune ou un cancer. De nos jours, malgré l'existence d'un réel besoin, il n'existe quasiment pas de traitement anti-infectieux efficaces dans le traitement des phases chroniques. D'autre part, les effets bénéfiques des petites molécules (antibiotiques, anti-parasitaires, anti-viraux) lors des phases aiguës des infections sont de plus en plus compromis par le développement de résistance croisée. Ainsi l'apparition de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques pose un problème de santé publique avec 6% à 7% des hospitalisations compliquées par une

- 4 -

infection nosocomiale plus ou moins grave, soit environ 750 000 cas sur les 15 millions d'hospitalisations annuelles (<http://www.senat.fr/rap/r05-421/r05-4211.html#toc13>). Au total, les infections nosocomiales seraient donc en cause pour 5 9 000 décès par an, dont 4 200 concernent des patients pour lesquels le pronostic vital n'était pas engagé à court terme à leur entrée à l'hôpital (<http://www.senat.fr/rap/r05-421/r05-4213.html>). Ainsi, il apparaît nécessaire de développer des médicaments innovants qui offriront une alternative 10 thérapeutique aux médecins et à leurs patients.

Une tumeur correspond à une masse néoplasique résultant de la prolifération incontrôlée de cellules qui peut être bénigne ou maligne. Les tumeurs bénignes restent généralement 15 localisées. Les tumeurs malignes sont appelées collectivement cancers. Le terme "malin" signifie en général que la tumeur est capable d'envahir et détruire les structures adjacentes et de diffuser vers des sites distants provoquant à terme la mort du patient (Robbins and Angell, 1976, Basic Pathology, 2d Ed., 20 W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 68-122). Un cancer peut survenir dans de nombreuses localisations différentes et se comporter différemment en fonction de son origine tissulaire. Actuellement, les moyens de traitement des cancers sont la 25 chirurgie, la chimiothérapie, la thérapie hormonale et/ou l'irradiation pour éradiquer les cellules tumorales présentes chez le patient (Stockdale, 1998, "Principles of Cancer Patient Management", in Scientific American: Medicine, vol. 3, Rubenstein and Federman, Eds., Chapter 12). Tous ces traitements présentent des inconvénients majeurs. Par exemple, 30 malgré la disponibilité d'une grande variété de molécules chimiques, la chimiothérapie induit de nombreux effets secondaires comme les nausées sévères, l'aplasie médullaire, l'immunosuppression, etc. La gravité de certains de ces effets oblige parfois le médecin à arrêter le traitement. De plus, 35 malgré l'administration d'une combinaison de plusieurs molécules chimiques, la plupart des cellules tumorales sont résistantes ou développent une résistance aux agents de

- 5 -

chimiothérapie. De fait, les cellules résistantes à un agent particulier administré dans le protocole en cours, sont malheureusement aussi résistantes à d'autres drogues, y compris celles agissant par un mécanisme différent de celui utilisé par l'agent administré dans le protocole de traitement. Ce phénomène, connu sous le nom de résistance multidrogues, est souvent à l'origine de l'échec thérapeutique des protocoles standards de chimiothérapie.

10 Il existe donc un réel besoin pour des thérapies anticancéreuses innovantes en particulier pour le traitement des cancers réfractaires aux traitements classiques tels que la chirurgie, l'irradiation, la chimiothérapie ou la thérapie hormonale.

15 Une alternative prometteuse est l'immunothérapie, dans laquelle les cellules tumorales sont spécifiquement ciblées par les anticorps spécifiques des antigènes tumoraux. Des efforts majeurs ont été réalisés afin d'exploiter la spécificité de la réponse immune, par exemple la technologie des hybridomes a permis le développement des anticorps monoclonaux spécifiques d'antigènes exprimés par les cellules tumorales (Green M. C. et al., 2000 Cancer Treat Rev., 26: 269-286; Weiner L M, 1999 Semin Oncol. 26(suppl. 14):43-51).

25 La destruction des cellules délétères de l'hôte ou des agents pathogènes correspond au mécanisme recherché d'efficacité des anticorps monoclonaux quelle que soit la pathologie ciblée. Il est donc critique que ces anticorps soient améliorés de façon à interagir de manière optimale avec les cellules effectrices du système immunitaire du patient.

30 La leucémie lymphoïde chronique B (LLC-B), maladie caractérisée par une prolifération maligne des lymphocytes B (LB), est la forme de leucémie la plus fréquente. Le traitement actuel est essentiellement basé sur l'abstention thérapeutique pour les stades précoces de la maladie. En cas de symptomatologie clinique ou hématologique, les patients sont classiquement traités par des corticoïdes seuls ou en

- 6 -

association avec des molécules anti-mitotiques. Chez la plupart des patients, une résistance au traitement s'installe à plus ou moins long terme. Elle aboutit généralement à l'échec de l'effort thérapeutique avec apparition de cellules chimio-résistantes. La chimiothérapie est responsable d'effets secondaires majeurs avec notamment une myélotoxicité générant un déficit immunitaire responsable de l'apparition d'infections graves, parfois mortelles, chez les patients. Plusieurs approches thérapeutiques visant à détruire le plus spécifiquement possible les cellules B tumorales ont été évaluées. L'expression spécifique de la molécule CD20 par les LB tumoraux (et normaux) a permis le développement de thérapies basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-CD20 humain.

15

Un seul anticorps monoclonal anti-CD20 non radiomarqué, le rituximab (Rituxan[®], Genentech et Mabthéra[™], Roche), est actuellement disponible sur le marché. Il est indiqué pour le traitement de patients atteints de lymphomes folliculaires de stade III-IV et en association à une chimiothérapie pour le traitement des patients présentant un lymphomes non-hodgkinien (NHL) agressif diffus à grandes cellules B, CD20 positives. Son efficacité restant variable et souvent modeste lorsqu'il est utilisé comme agent unique (Teeling et al. 2004, Blood 104(6):1793-800), il est le plus souvent utilisé en association à de la chimiothérapie.

20

25

Le rituximab a aussi été évalué chez les patients atteints de LLC-B. Cet anticorps n'ayant présenté qu'une efficacité faible lorsqu'il était utilisé en monothérapie, il est actuellement administré en association avec la chimiothérapie.

30

Plusieurs raisons peuvent expliquer l'échec de la monothérapie par le rituximab chez les patients atteints de LLC-B: d'une part, le rituximab induit *in vitro* une faible activité ADCC sur des cellules B, d'autre part, contrairement aux LB normaux et dans les NHL, les LB de LLC-B n'expriment que peu de molécules CD20 à leur surface (densité environ 5 fois inférieure, mesure quantitative par cytométrie en flux),

35

- 7 -

limitant ainsi la quantité d'anticorps à la surface cellulaire et ainsi les fonctions cytotoxiques associées (ADCC et activité complément notamment).

Il est donc de première importance de mettre au point des
5 thérapies alternatives parmi lesquelles des anticorps spécifiques de l'antigène CD20 et capables d'induire efficacement la lyse des cellules tumorales, y compris celles exprimant faiblement l'antigène.

Les macrophages, cellules effectrices de l'immunité innée,
10 jouent un rôle majeur dans les réponses anti-tumorales. Naturellement présents sous une forme inactivée (en l'absence de toute pathologie), ils peuvent être activés *in vivo* ou *in vitro* par différentes voies comme l'ingestion de pathogènes ou la liaison aux récepteurs exprimés en surface de complexes
15 immuns (liaison aux RFc via la région Fc des anticorps) ou de cytokines, molécules immuno-modulatrices produites notamment lors d'un phénomène inflammatoire. L'activation induit chez les macrophages une activité lytique, et donc anti-tumorale, accrue (Adams D. and Hamilton T.: Activation of macrophages
20 for tumor cell kill: effector mechanism and regulation. In Heppner & Fulton (Eds), Macrophages and cancer. CRC Press, 1988, p. 27; Fidler I.: Macrophages and metastases. A biological approach to cancer therapy. Cancer Res, 45: 4714, 1985).

25 De plus, les macrophages, ou autres cellules dérivées des monocytes ou de leurs précurseurs, sont des cellules présentatrices d'antigènes. De par leur importante capacité d'endocytose, de digestion et de présentation aux lymphocytes T des peptides antigéniques associés aux molécules du complexe
30 majeur d'histocompatibilité (CMH), ils sont capables d'induire une réponse immune spécifique.

Dans le but d'accroître l'efficacité du rituximab, son association avec des macrophages activés *ex vivo* en présence
35 d'interféron- γ (IFN- γ) a été évaluée *in vitro* dans un test de lyse de cellules primaires de LLC-B (Lefebvre ML, Stefan W. Krause, Salcedo M, Nardin A. *Ex vivo* activated human macrophages kill chronic lymphocytic leukemia cells in the

- 8 -

presence of Rituximab: mechanism of antibody-dependent cellular cytotoxicity and impact of human serum. J. Immunother; vol. 29, n°4: 388-397, 2006). Les résultats indiquent que la lyse importante des cellules de LLC-B par les
5 macrophages activés en présence de rituximab est fortement inhibée par des concentrations croissantes de sérum humain. Cette inhibition est liée à la compétition par les immunoglobulines polyclonales présentes dans le sérum vis à vis de la liaison du complexe rituximab-cellule LLC aux
10 différents RFc exprimés à la surface des macrophages. L'intensité de cette inhibition dépend des concentrations de rituximab et du ratio cellules effectrices:cellules cibles (Effector:Target ou E:T) utilisés.

15 En dépit de l'existence de nombreux outils thérapeutiques pour le traitement des cancers, des maladies auto-immunes, ou des maladies infectieuses, il existe encore un grand besoin de nouveaux produits d'immunothérapie, faisant preuve d'une meilleure efficacité et d'une meilleure sécurisation que les
20 produits existants.

RESUME DE L'INVENTION

Un premier objet de l'invention est un ensemble de moyens
25 pour le traitement d'une pathologie maligne, d'une maladie auto-immune ou d'une maladie infectieuse, comprenant une cellule effectrice qui exprime le récepteur FcγRIII (CD16) à sa surface, et un anticorps monoclonal, dans lequel l'affinité de la région Fc dudit anticorps monoclonal pour le CD16 est
30 supérieure à l'affinité de la région Fc des immunoglobulines polyclonales pour le CD16.

Avantageusement, la cellule effectrice qui exprime le récepteur FcγRIII (CD16) à sa surface est un monocyte ou une cellule dérivée de monocyte ou d'un précurseur de monocyte qui
35 exprime le récepteur FcγRIII (CD16) à sa surface.

Avantageusement, cette cellule est choisie parmi les monocytes exprimant le CD16, les macrophages, les cellules

Natural Killer (NK), les cellules dendritiques et l'ensemble des cellules mononucléées du sang périphérique (Peripheral Blood Mononuclear Cell ou PBMC).

Avantageusement, la cellule exprimant le CD16 à sa surface est choisie parmi les monocytes exprimant le CD16, les macrophages et les cellules dendritiques.

Plus particulièrement, la cellule dérivée de monocyte ou d'un précurseur de monocyte, qui exprime le CD16 à sa surface, est un macrophage.

Avantageusement, l'anticorps monoclonal n'est pas déplacé par les immunoglobulines polyclonales, particulièrement celles présentes dans le sérum, ceci en raison de l'affinité élevée de la région Fc dudit anticorps monoclonal pour le CD16.

Avantageusement, l'anticorps monoclonal lie le CD16 de ladite cellule dérivée de monocyte ou d'un précurseur de monocyte avec une affinité supérieure à $2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$.

D'une manière particulièrement avantageuse, l'anticorps monoclonal est produit sous forme d'une composition d'anticorps monoclonaux, dans laquelle chaque anticorps possède des chaînes de sucre liées en N au site de glycosylation Fc γ (asparagine 297, selon Kabat), et dans laquelle parmi toutes les chaînes de sucre liées en N audit site de glycosylation de tous les anticorps de ladite composition, le taux de fucose est inférieur à 65%.

25

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, l'anticorps monoclonal est dirigé contre un antigène choisi parmi l'antigène 5C5 (antigène tumoral exprimé par les cellules des carcinomes rénaux), le BCR (B Cell Receptor), un idiotype comme celui des anticorps inhibiteurs anti-FVIII, le TCR (T Cell Receptor), CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD45, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD46, CD52, CD54, CD66 (a,b,c, d), CD74, CD80, CD86, CD126, CD138, CD154, MUC1 (Mucine 1), MUC2 (Mucine 2), MUC3 (Mucine 3), MUC4 (Mucine 4), MUC16 (Mucine 16), la HM1.24 (antigène spécifique des plasmocytes sur-exprimé dans les myélomes multiples), tenascin (protéine de la matrice extra-

- 10 -

cellulaire), GGT (gamma-glutamyltranspeptidase), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), EGFR (Endothelial Growth Factor receptor), CEA (carcinoembryonic antigen), CSAp (colon-specific antigen-p), ILGF (Insulin-Like Growth factor), placental growth factor, Her2/neu, anhydrase carbonique IX, IL-6, les protéines S100 (famille multigénique de protéines se liant au calcium), MART-1 (antigène tumoral de différenciation associé au mélanome), TRP-1 (tyrosinase related protein 1), TRP-2 (tyrosinase related protein 2), gp100 (glycoprotéine 100 kDa), les protéines amyloïdes, l'antigène rhésus D, les molécules du CMH de classe I et II comme HLA-DR), un antigène résultant de l'expression de gènes mutés notamment des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur, un antigène dérivé de virus oncogènes exprimés par certaines tumeurs bien définies, un antigène ubiquitaire surexprimé dans certaines tumeurs et faiblement exprimés dans certains tissus normaux comme par exemple le récepteur de type II de l'hormone Müllérienne, une protéine glycosylée ou pas, un phospholipide, une molécule du soi ou du non soi exprimée ou exposée à la membrane par les cellules infectées comme la phosphatidylsérine, et une protéine exprimée ou secrétée par un agent pathogène (toxine bactérienne, les protéines complexes de la paroi bactérienne ou parasitaire, les glycoprotéines d'enveloppe virale, par exemple de virus HIV, HBV, HCV et RSV, etc.).

Préférentiellement, l'anticorps monoclonal est dirigé contre le CD20.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, l'anticorps anti-CD20 est produit par la lignée cellulaire R509 déposée à la CNCM le 8 Novembre 2004 sous le numéro d'accèsion I-3314, ou par la lignée cellulaire R603, déposée à la CNCM le 29 Novembre 2005 sous le numéro d'accèsion I-3529 (CNCM: Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 - France).

- 11 -

Avantageusement, l'ensemble de moyens de l'invention est destiné à une utilisation en thérapie de manière simultanée, séquentielle ou séparée.

Avantageusement, dans l'ensemble de moyens de l'invention, 5 la cellule effectrice exprimant le CD16 à sa surface a une activité cytotoxique sur la cellule cible dudit anticorps favorisée par l'interaction de l'anticorps avec le CD16.

Avantageusement, dans l'ensemble de moyens de l'invention, 10 l'anticorps monoclonal induit une cytotoxicité par activité ADCC ou par phagocytose de ladite cellule cible de l'anticorps en présence d'une cellule effectrice exprimant le CD16.

Un autre objet de l'invention est une composition 15 pharmaceutique contenant l'ensemble de moyens selon l'invention, et des excipients pharmaceutiquement acceptables.

Un autre objet de l'invention se rapporte à l'utilisation de l'ensemble de moyens de l'invention pour la fabrication 20 d'un médicament.

Un autre objet de l'invention se rapporte à l'utilisation de l'ensemble de moyens de l'invention pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement d'une pathologie 25 maligne.

Avantageusement, la pathologie maligne est choisie parmi les tumeurs solides et les hémopathies malignes. Avantageusement, les tumeurs solides sont sélectionnées parmi 30 les mélanomes, les carcinomes, les sarcomes, les gliomes et les cancers cutanés. Avantageusement, les carcinomes sont sélectionnés dans le groupe constitué par les carcinomes du rein, du sein, de la cavité orale, des poumons, du tractus gastro-intestinal, des ovaires, de la prostate, de l'utérus, 35 de la vessie, du pancréas, du foie, de la vésicule biliaire, de la peau et des testicules.

- 12 -

Avantageusement, les hémopathies malignes sont sélectionnées parmi les syndromes lymphoprolifératifs, myéloprolifératifs, myélodysplasiques et les leucémies myéloïdes aiguës avec, par exemple, les lymphomes non-
5 hodgkiniens de type B, les leucémies B lymphoïdes aiguës ou chroniques, le lymphome de Burkitt, la leucémie à tricholeucocytes, les leucémies myéloïdes aiguës et chroniques, les lymphomes et les leucémies T, lymphomes Hodgkiniens, la macroglobulinémie de Waldenström et les
10 myélomes multiples.

Un autre objet de l'invention se rapporte à l'utilisation de l'ensemble de moyens de l'invention pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement d'une maladie auto-
15 immune et/ou inflammatoire primitive ou secondaire, spécifique d'organes ou systémiques et associée ou non à des auto-anticorps pathogènes.

Avantageusement, la maladie auto-immune et/ou inflammatoire
20 est choisie parmi le rejet de greffe d'organes, la maladie du greffon contre l'hôte, la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé, la sclérodermie, le syndrome de Sjögren primitif (ou Syndrome de Gougerot-Sjögren), les polyneuropathies auto-immunes comme la sclérose en plaques, le
25 diabète de type I, les hépatites auto-immunes, la spondylarthrite ankylosante, le syndrome de Reiter, l'arthrite de goutte, la maladie coeliaque, la maladie de Crohn, la thyroïdite d'Hashimoto, la maladie d'Addison, les hépatites auto-immunes, la maladie de Basedow, la colite ulcéraire, les
30 vascularites comme les vascularites systémiques associés aux ANCA (anticorps anti-cytoplasme des neutrophiles), les cytopénies auto-immunes et autres complications hématologiques de l'adulte et de l'enfant, telles que les thrombopénies auto-immunes aiguës ou chroniques, les anémies hémolytiques auto-immunes,
35 la maladie hémolytique du nouveau-né (MHN), la maladie des agglutinines froides, le purpura thrombotique thrombocytopénique et l'hémophilie acquise auto-immune; le

- 13 -

syndrome de Goodpasture, les néphropathies extra-membraneuses, les affections cutanées bulleuses auto-immunes, la myasthénie réfractaire, les cryoglobulinémies mixtes, le psoriasis, l'arthrite chronique juvénile, les myosites inflammatoires, les dermatomyosites et les affections systémiques auto-immunes de l'enfant incluant le syndrome des antiphospholipides.

Un autre objet de l'invention se rapporte à l'utilisation de l'ensemble de moyens de l'invention pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement d'une maladie infectieuse.

Avantageusement, la maladie infectieuse est choisie parmi celles induites par les virus (virus de l'immunodéficience humaine ou VIH, virus de l'hépatite B ou C (HBV, HCV), virus Epstein-Barr ou EBV, cytomégalovirus ou CMV, les entérovirus, la grippe avec les virus Influenza A, B et C, le virus respiratoire syncytial ou VRS, Human T cell Lymphotropic Virus ou HTLV), les bactéries et/ou leurs toxines (tétanos, diphtérie, pneumocoques, méningocoques, staphylocoques y compris les formes méthiciline résistantes, les Klebsielles, les Shigelles, les pseudomonas aeruginosa, les entérobactéries ou les pathologies résistantes aux antibiotiques dont les maladies nosocomiales), les parasites (paludisme, leishmanioses, trypanosomiasés) ainsi que les maladies émergentes par exemple le Chikungunya, la grippe aviaire, le virus du syndrome respiratoire aigu sévère ou SRAS, les virus responsables de fièvres hémorragiques comme Ebola ou Dengue ou le virus du Nil occidental, et celles reliées au bio-terrorisme comme le Charbon, le Botulisme, la Peste, la Variole et poxvirus, la Tularémie, les Agents des fièvres hémorragiques, la Brucellose, les Entérotoxines B du Staphylocoque, la Toxine diphtérique ou les Encéphalites virales.

DESCRIPTION DETAILLEE**Ensemble de moyens**

Le terme « ensemble de moyens » désigne une association médicamenteuse dont les constituants élémentaires forment une unité fonctionnelle du fait de leur indication commune. Ici, le terme ensemble de moyens représente en fait un « kit of parts ».

Plus spécifiquement, l'ensemble de moyen de l'invention est une association médicamenteuse contenant, comme substance active, une cellule effectrice qui exprime le CD16 à sa surface et un anticorps monoclonal dans lequel l'affinité de la région Fc de cet anticorps monoclonal pour le CD16 est plus grande que l'affinité de la région Fc des immunoglobulines polyclonales pour le CD16, pour une utilisation simultanée, séparée ou séquentielle, dans le traitement de pathologies malignes, de maladies auto-immunes, ou de maladies infectieuses.

L'anticorps monoclonal et la cellule effectrice, qui exprime le CD16 à sa surface, forment ensemble une composition sous forme « d'ensemble de moyens » unitaire, dont les constituants sont disponibles pour une application simultanée, ou séparée, ou étalée dans le temps. L'ensemble de moyens de l'invention peut également se présenter sous forme de mélange.

L'anticorps monoclonal et la cellule effectrice qui exprime le CD16 forment une unité fonctionnelle du fait d'un nouvel effet commun et donc d'une indication commune.

Cellule effectrice qui exprime le récepteur FcγRIII (CD16) à sa surface

On entend par "cellule effectrice qui exprime le récepteur CD16 à sa surface" toute cellule capable d'activité effectrice (en particulier une activité cytotoxique par ADCC, phagocytose, ou dans un autre domaine des propriétés de présentation antigénique et de réponse humorale) suite à l'activation cellulaire induite par la liaison au récepteur membranaire FcγRIII ou CD16 d'un complexe immun formé par l'association d'un anticorps avec l'antigène dont il est

spécifique. Ces cellules expriment nécessairement le CD16 à leur surface.

Avantageusement, une telle cellule peut être une cellule dérivée de monocyte ou d'un précurseur de monocyte qui exprime le CD16 à sa surface, un monocyte CD16+, un macrophage, une cellule dendritique, cette liste n'étant pas limitative.

Ainsi, cette liste peut également s'étendre aux cellules Natural Killer (NK) et aux PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell). On entend par « cellules NK » de grands lymphocytes granuleux capables d'une activité cytotoxique spontanée sans immunisation antérieure. On entend par « PBMC » toute cellule mononucléée du sang périphérique (monocytes et lymphocytes), et qui exprime le CD16 à sa surface.

De telles cellules sont ainsi capables d'induire une activité ADCC en présence des anticorps monoclonaux de l'invention, en raison de la liaison entre la région Fc des anticorps monoclonaux et le récepteur CD16 exprimé par la cellule.

Préférentiellement, la cellule effectrice est un macrophage.

Le monocyte CD16+ (c'est-à-dire exprimant le CD16 à sa surface) est une sous population de monocyte exprimant le CD16 à la surface de sa membrane. Les monocytes CD16+ sont capables de phagocyter et d'induire une activité ADCC.

Le macrophage est l'un des acteurs principaux de l'immunité innée et participe à l'immunité adaptative. Il est issu de la différenciation des monocytes.

A titre d'exemple, des macrophages peuvent être dérivés à partir d'une suspension cellulaire fortement enrichie en monocytes comprenant une étape de culture dans un milieu de culture approprié (milieu RPMI[®] pour Roswell Park Memorial Institute) contenant du M-CSF (Monocyte-Colony Stimulating Factor) ou du GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor) pour induire la différenciation des

- 16 -

monocytes en macrophages. Ces derniers peuvent être générés, par exemple, en six-sept jours de culture.

Il est également possible d'obtenir des macrophages à partir d'une composition enrichie en cellules sanguines obtenue par cytophérèse réalisée sur un individu sain, et en effectuant une étape de culture de monocytes dans un milieu de culture contenant du M-CSF (Monocyte Colony Stimulating Factor) ou du GM-CSF (Granulocytes Macrophages Colony Stimulating Factor).

Optionnellement, cette étape de culture peut avantageusement être précédée par une étape de séparation, d'une part, des cellules mononucléaires, et, d'autre part, des globules rouges, granulocytes et d'une partie des plaquettes contenus dans la composition dérivée du sang obtenue par cytophérèse, et par une étape d'élimination, par lavage, d'une partie des plaquettes sanguines et des anticoagulants restant après l'étape précédente.

L'étape d'enrichissement de la suspension cellulaire en monocytes susmentionnée est généralement réalisée par centrifugation du milieu contenant les monocytes sur un gradient de densité, notamment sur une solution ayant une densité d'environ 1,0 à environ 1,3 g/ml, telle qu'une solution du type Ficoll Paque (Pharmacia) ayant une densité de 1,077 g/ml.

Optionnellement, une composition contenant des macrophages, et/ou des cellules dendritiques, et/ou des cellules NK peut être obtenue en partant d'une composition dérivée du sang d'origine humaine, et enrichie en cellules sanguines, et, plus particulièrement, en globules blancs tels que les monocytes, ou en précurseurs de ces derniers, notamment d'une composition dérivée du sang telle qu'obtenue par cytophérèse, ledit procédé comprend les étapes suivantes:

- Avantageusement, une dilution de ladite composition dérivée du sang, notamment dans environ 2 à 3 fois le volume de cette dernière, à l'aide d'une solution physiologique appropriée,

- 17 -

- une étape de lavage de ladite composition dérivée du sang, avantageusement par centrifugation simple et lavage du culot issu de la centrifugation susmentionnée, après récupération du culot dans une solution physiologique de lavage appropriée, notamment dans une poche (du type poche de transfert), en effectuant par exemple une pression sur ladite poche, la solution de lavage étant alors éliminée vers une autre poche ou autre récipient, pour récupérer une composition dépourvue d'éventuels anticoagulants et de résidus divers et appauvrie en plaquettes,
 - le cas échéant répétition de l'opération de lavage susmentionnée, notamment entre 1 et 2 fois,
 - une étape de culture des cellules contenues dans la composition dérivée du sang obtenue après l'étape de lavage susmentionnée, en plaçant celle-ci dans un milieu de culture approprié, notamment dans une poche avantageusement hydrophobe, pendant environ 6 à environ 10 jours (notamment d'environ 6 à 7 jours),
- cette étape de culture étant:
- précédée par une étape d'élimination de tout ou partie des constituants autres que les monocytes, ou leurs précurseurs, susceptibles d'être présents dans la composition de départ, notamment des plaquettes, des globules rouges, des granulocytes et des lymphocytes, par mise en contact de la composition dérivée du sang obtenue après l'étape de lavage précédant l'étape de culture, avec des anticorps dirigés contre tout ou partie des constituants susmentionnés, et récupération de la solution contenant les monocytes, ou leurs précurseurs, tout ou partie des constituants susmentionnés restant fixés aux anticorps, et/ou suivie par une étape d'élimination de tout ou partie des constituants autres que les macrophages par mise en contact de la composition dérivée du sang obtenue après l'étape de culture avec les anticorps tels que décrits ci-dessus, et récupération de la solution contenant les

- 18 -

macrophages, tout ou partie des constituants susmentionnés restant fixés aux anticorps,

- et/ou suivie par une étape de purification, notamment par élutriation, dans laquelle les macrophages sont
5 séparés des autres constituants de la composition obtenue après l'étape de culture, notamment des plaquettes, des globules rouges et des lymphocytes, par voie physique.

10 D'une façon plus générale, tout autre procédé d'obtention de macrophages, conduisant à l'expression du CD16 à leur surface est également applicable à l'invention.

De plus, on doit entendre par « macrophage » au sens de la présente invention toute cellule obtenue à partir de monocytes et différenciés selon un protocole bien déterminé, conduisant
15 à des cellules exprimant les marqueurs membranaires suivants: CD14+, CD16+, CD32+, CD64+, CD11b+. En particulier, le pourcentage de cellules CD16+ est d'au moins 20%, préférentiellement 50%, ou 70% ou compris entre 70 et 100%.

20 Anticorps monoclonaux

Aux fins de l'invention, les expressions « anticorps monoclonal » ou « composition d'anticorps monoclonal » se réfèrent à une préparation de molécules d'anticorps issue d'un clone cellulaire et possédant une spécificité identique et
25 unique.

Une molécule d'immunoglobuline est composée de 4 polypeptides: 2 chaînes lourdes (H, Heavy) identiques de 50 kDa chacune et 2 chaînes légères (L, Light) identiques de
30 25 kDa chacune. La chaîne légère est composée de 2 domaines, un domaine variable V et un domaine constant C, repliés indépendamment l'un de l'autre dans l'espace. On les appelle VL et CL. La chaîne lourde comporte également un domaine V noté VH et 3 ou 4 domaines C noté de CH1 à CH4. Chaque domaine
35 comprend environ 110 acides aminés et est structuré de manière comparable. Les 2 chaînes lourdes sont liées par des ponts

- 19 -

disulfures et chaque chaîne lourde est liée à une chaîne légère par un pont disulfure également.

La région qui détermine la spécificité de l'anticorps pour l'antigène est portée par les parties variables, alors que les parties constantes peuvent interagir avec les récepteurs Fc des cellules effectrices ou des molécules comme les protéines du complément pour induire différentes propriétés fonctionnelles.

Quant aux régions variables des chaînes lourdes et légères, on constate que la variabilité de séquence n'est pas distribuée de manière égale. En effet, les régions variables sont constituées d'une part de régions très peu variables nommées « charpente » ou « framework » (FR) au nombre de 4 (FR 1 à FR4) et d'autre part de régions dans lesquelles la variabilité est extrême: il s'agit des régions « hypervariables », ou CDR (pour régions de détermination de complémentarité ou Complementarity Determining Regions), au nombre de 3 (CDR1 à CDR3).

Avantageusement, l'anticorps selon l'invention est un anticorps chimérique, humanisé ou humain.

De manière préférentielle, l'anticorps selon l'invention est chimérique.

On entend par « anticorps chimérique » un anticorps dont les régions variables des chaînes légères et des chaînes lourdes appartiennent à une espèce différente des régions constantes des chaînes légères et des chaînes lourdes. Ainsi, l'anticorps selon l'invention possède en outre des régions variables murines, ou de rat, ou de lapin, ou de singe, ou de chèvre, ou humaine et des régions constantes appartenant à une espèce différente de l'espèce où a été produit l'anticorps. A cet égard, toutes les familles et espèces de mammifères sont susceptibles d'être utilisées, et en particulier l'homme, le singe, les muridés, les suidés, les bovidés, les équidés, les félidés, les canidés, par exemple, ainsi que les oiseaux. De manière encore préférée, les régions constantes de chacune des chaînes légères et de chacune des chaînes lourdes de

- 20 -

l'anticorps selon l'invention sont des régions constantes humaines. Ce mode de réalisation préféré de l'invention permet de diminuer l'immunogénicité de l'anticorps chez l'homme et par là même d'améliorer son efficacité lors de son administration thérapeutique chez l'homme.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, la région constante de chacune des chaînes légères de l'anticorps selon l'invention est de type κ . Tout allotype convient à la réalisation de l'invention, par exemple Km(1), Km(1, 2), Km(1, 2, 3) ou Km(3).

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, la région constante de chacune des chaînes légères de l'anticorps selon l'invention est de type λ .

Dans un aspect particulier de l'invention, et notamment lorsque les régions constantes de chacune des chaînes légères et de chacune des chaînes lourdes de l'anticorps selon l'invention sont des régions humaines, la région constante de chacune des chaînes lourdes de l'anticorps est de type γ . Selon cette variante, la région constante de chacune des chaînes lourdes de l'anticorps peut être de type γ_1 , de type γ_2 , de type γ_3 , ces trois types de régions constantes présentant la particularité de fixer le complément humain, ou encore de type γ_4 . Les anticorps possédant une région constante de chacune des chaînes lourdes de type γ appartiennent à la classe des IgG. Les immunoglobulines de type G (IgG), sont des hétérodimères constitués de 2 chaînes lourdes et de 2 chaînes légères, liées entre elles par des ponts disulfures. Chaque chaîne est constituée, en position N-terminale, d'une région ou domaine variable (codée par les gènes réarrangés V-J pour la chaîne légère et V-D-J pour la chaîne lourde) spécifique de l'antigène contre lequel l'anticorps est dirigé, et en position C-terminale, d'une région constante, constituée d'un seul domaine CL pour la chaîne légère ou de 3 domaines (CH1, CH2 et CH3) pour la chaîne lourde. L'association des domaines variables et des domaines CH₁ et CL des chaînes lourdes et légères forme les parties Fab, qui sont connectées à la région Fc par une région

- 21 -

charnière très flexible permettant à chaque Fab de se fixer à sa cible antigénique tandis que la région Fc, médiatrice des propriétés effectrices de l'anticorps reste accessible aux molécules effectrices telles que les récepteurs Fc γ R et le Clq. La région Fc, constituée des 2 domaines globulaires C γ_2 et C γ_3 , est glycosylée au niveau du domaine C γ_2 avec la présence, sur chacune des 2 chaînes, d'un N-glycane biantenné, lié à l'asparagine 297.

De manière préférée, la région constante de chacune des chaînes lourdes de l'anticorps est de type γ_1 , car un tel anticorps montre une capacité à engendrer une activité ADCC (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity) chez le plus grand nombre d'individus (humains). A cet égard, tout allotype convient à la réalisation de l'invention, par exemple G1m(3), G1m(1, 2, 17), G1m(1, 17) ou G1m(1,3).

Les anticorps chimériques selon l'invention peuvent être construits en utilisant les techniques standard de l'ADN recombinant, bien connues de l'homme du métier, et plus particulièrement en utilisant les techniques de construction des anticorps chimériques décrites par exemple dans Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81: 6851-55 (1984), où la technologie de l'ADN recombinant est utilisée pour remplacer la région constante d'une chaîne lourde et/ou la région constante d'une chaîne légère d'un anticorps provenant d'un mammifère non-humain avec les régions correspondantes d'une immunoglobuline humaine. De tels anticorps et leur mode de préparation ont également été décrits dans la publication brevet EP 173 494, dans le document Neuberger, M.S. et al., Nature 1985 Mar 21-27;314(6008):268-70., ainsi que dans le document EP 125 023 par exemple. Des méthodes pour générer des anticorps chimériques sont largement disponibles pour l'homme du métier. Par exemple, les chaînes lourdes et légères de l'anticorps peuvent être exprimées séparément en utilisant un vecteur pour chaque chaîne, ou bien être intégrées dans un seul vecteur.

Un vecteur d'expression est une molécule d'acide nucléique dans laquelle la séquence d'acide nucléique codant pour le

- 22 -

domaine variable de chacune des chaînes lourdes ou légères de l'anticorps et/ou la séquence d'acide nucléique, de préférence humaine, codant pour la région constante de chacune des chaînes lourdes ou légères de l'anticorps ont été insérées, afin de les introduire et de les maintenir dans une cellule hôte. Il permet l'expression de ces fragments d'acide nucléique étrangers dans la cellule hôte car il possède des séquences indispensables (promoteur, séquence de polyadénylation) à cette expression. Le vecteur peut être par exemple un plasmide, un adénovirus, un rétrovirus ou un bactériophage, et la cellule hôte peut être toute cellule de mammifère, par exemple SP2/0, YB2/0, IR983F, le myélome humain Namalwa, PERC6, les lignées CHO, notamment CHO-K-1, CHO-Lec10, CHO-Lec1, CHO-Lec13, CHO Pro-5, CHO dhfr-, Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7, 293-HEK, BHK, K6H6, NS0, SP2/0-Ag 14 et P3X63Ag8.653.

Pour la construction de vecteurs d'expression des anticorps chimériques selon l'invention, des séquences signal synthétiques et des sites de restriction appropriés peuvent être fusionnés aux régions variables au cours des réactions d'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction). Les régions variables sont ensuite combinées avec les régions constantes d'un anticorps, de manière préférentielle une IgG1 humaine. Les gènes ainsi construits sont clonés sous le contrôle d'un promoteur (par exemple le promoteur RSV) et en amont d'un site de polyadénylation, en utilisant soit deux vecteurs séparés (un pour chaque chaîne) soit un vecteur unique. Le ou les vecteurs sont également munis de gènes de sélection connus de l'homme du métier, tels que par exemple le gène dhfr, le gène de résistance à la néomycine.

Les anticorps chimériques selon l'invention peuvent être produits par co-transfection ou transfection simple dans une cellule hôte du vecteur d'expression de la chaîne légère et du vecteur d'expression de la chaîne lourde ou du vecteur unique en utilisant une méthode bien connue de l'homme du métier (par

- 23 -

exemple la co-précipitation au phosphate de calcium, l'électroporation, la micro-injection, etc.).

Par anticorps humanisé, on entend désigner un anticorps qui contient des régions CDRs dérivées d'un anticorps d'origine non humaine, les autres parties de la molécule d'anticorps étant dérivées d'un (ou de plusieurs) anticorps humains. De tels anticorps peuvent être préparés selon des méthodes de greffe de CDR (« CDR-grafting ») bien connues de l'homme du métier (brevet US 5,225,539, US 6,180,370; Jones et al., Nature 321(6069): 522-5. (1986); Verhoeyen et al., Bioessays 8(2): 74-8 (1988); Riechmann et al., Nature 332: 323-7 (1988); Queen C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 86(24):10029-33 (1989); Lewis A.P. and Crowe J.S., Gene 101(2):297-302 (1991); Daugherty BL et al., Nucleic Acids Res. 19(9):2471-6 (1991); Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 :4285 (1992); Singer et al., J. Immunol. 150 (7): 2844-57 (1993); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)). Le choix des domaines variables humains à greffer pour la production d'anticorps humanisés est important afin de réduire l'immunogénicité de l'anticorps sans altérer son affinité pour sa cible. Dans une méthode de production d'un anticorps humanisé, la séquence du domaine variable d'un anticorps murin est comparée à une banque de séquences de régions variables humaines connues et la séquence variable humaine la plus proche de la séquence murine est retenue comme région FR (« framework ») de l'anticorps humanisé [Riechmann et al., Nature 332: 323-7 (1988); Queen C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(24):10029-33 (1989); Sims et al., J. Immunol., 151 :2296 (1993)]. Une autre méthode de sélection des régions FR humaines est la comparaison de la séquence de chaque sous-région de la séquence FR murine (FR1, FR2, FR3 et FR4) avec une banque de séquences FR humaines connues, afin de choisir, pour chaque région FR, la séquence FR humaine la plus proche de la séquence murine [publication brevet US 2003/0040606; Singer et al., J. Immunol. 150 (7): 2844-57 (1993); Sato K. et al, Mol. Immunol. 31(5):371-81 (1994); Leung S.O. et al., Mol. Immunol. 32(17-18):1413-27 (1995)]. Une autre méthode utilise

- 24 -

une région FR particulière dérivée d'une séquence consensus de tous les anticorps humains d'un sous-groupe particulier de chaîne lourde ou légère [Sato K. et al, Mol. Immunol. 31(5):371-81 (1994)]. La greffe de CDR est complétée dans la majorité des cas par la mutation de certains résidus clés localisés dans les FR humains afin de conserver une bonne affinité de l'anticorps humanisé pour sa cible [Holmes M.A. and Foote J., J. Immunol. 158(5):2192-201 (1997)].

Les anticorps humanisés selon l'invention sont préférés pour leur utilisation dans des méthodes de diagnostic *in vitro*, ou de traitement prophylactique et/ou thérapeutique *in vivo*.

L'anticorps selon l'invention ainsi chimérisé ou humanisé présente l'avantage d'être mieux toléré par l'organisme humain, et au moins aussi efficace que l'anticorps d'origine. De manière particulièrement avantageuse, l'anticorps ainsi chimérisé ou humanisé est 2 fois plus cytotoxique que l'anticorps natif correspondant. De manière encore plus avantageuse, l'anticorps ainsi chimérisé ou humanisé est 10 fois, ou encore 100 fois ou de manière préférée plus de 500 fois plus cytotoxique que l'anticorps natif correspondant.

Par anticorps humain, on entend désigner un anticorps dont chaque région est dérivée d'un anticorps humain. Ces anticorps peuvent être dérivés de souris transgéniques portant des gènes d'anticorps humains, ou de cellules humaines [Jakobovits et al., Curr Opin Biotechnol. Oct;6(5):561-6 (1995); Lonberg N. and D. Huszar. Internal Review of Immunology 13 :65-93 (1995); Tomizuka K. et al., Proc. Natl. Acad, Sci. USA 97(2): 722-727 (2000)].

De manière préférée, les anticorps chimériques, humanisés ou humains de l'invention sont produits au moyen des techniques de l'ADN recombinant connues de l'homme du métier. De manière préférée, les anticorps monoclonaux de l'invention peuvent être produits par une cellule isolée, par exemple

- 25 -

choisie parmi SP2/0, YB2/0, IR983F, le myélome humain Namalwa, PERC6, les lignées CHO, notamment CHO-K-1, CHO-Lec10, CHO-Lec1, CHO-Lec13, CHO Pro-5, CHO dhfr-, Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7, 293-HEK, BHK, K6H6, NS0, SP2/0-Ag 14 et
5 P3X63Ag8.653, cette liste n'étant pas limitative.

Les anticorps monoclonaux de l'invention peuvent également être produits au moyen d'un animal transgénique. La transgénèse est une technique de génétique moléculaire par
10 laquelle de l'ADN exogène est introduit dans le génome d'un organisme multicellulaire et est transmis à la descendance de ce dernier. Cette transmission à la descendance impose l'intégration stable dudit ADN dans le génome de l'embryon et ceci à un stade précoce de développement.

15 Par exemple, une des techniques de transgénèse susceptible d'être utilisée dans le cadre de l'invention consiste en la micro-injection d'ADN nu dans le pronucléus d'un ovocyte de mammifère fécondé ou dans des cellules souches embryonnaires dites, laquelle conduit, dans un certain nombre de cas, à
20 l'intégration d'une partie des molécules d'ADN microinjectées dans le génome de l'hôte. D'autres techniques sont utilisables pour la transgénèse, et notamment les techniques d'introduction d'ADN exogène dans une cellule vivante qui sont bien connues de l'homme du métier, notamment
25 l'électroporation, la transfection à l'aide de précipités de phosphate de calcium, de liposomes ou de lipides modifiés tels que la lipofectamine® (IN VITROGEN).

D'une manière préférentielle, l'anticorps monoclonal de l'invention est produit par l'animal transgénique dans son
30 lait. A ce titre, le gène codant pour la protéine d'intérêt est associé à des éléments régulateurs de gènes exprimés spécifiquement dans le lait (par exemple le promoteur du gène WAP, whey acidic protein). Le vecteur d'expression ainsi obtenu est micro-injecté sous microscope dans des embryons de
35 mammifère au stade unicellulaires. Les embryons sont ensuite transférés dans des femelles receveuses.

- 26 -

Par exemple, après un mois de gestation, les premiers mammifères ayant intégré le transgène (F0) dans leur génome naissent et sont identifiés par analyse PCR de biopsie d'oreille. Ils serviront de fondateurs pour donner naissance à la deuxième génération de mammifères transgéniques. Les fondateurs sont sélectionnés pour leur efficacité à produire la protéine d'intérêt dans leur lait et pour générer la seconde génération de lapins transgéniques (F1).

La descendance F1 est identifiée par biopsie de l'oreille suivie d'analyse par PCR. Les femelles F1 matures sexuellement sont alors inséminées avec du sperme de mâle non transgénique. Le lait est récolté mécaniquement et la protéine recombinante est caractérisée afin de sélectionner la meilleure lignée pour la production à grande échelle et pour développer la stratégie de purification (GLP, pré-GMP, GMP).

En parallèle, le sperme de mâles transgéniques F1 - Master Sperm Bank, MSB - est récolté et cryo-conservé dans de l'azote liquide, suivant les recommandations de la FDA et des instances européennes. Ce sperme sera utilisé pour inséminer artificiellement des femelles non-transgéniques pour générer la seconde descendance (F2). Le sperme de mâles transgéniques F2 - Working SpermBank, WSB - est récolté et servira, pendant 15-20 ans, à la génération de femelles transgéniques F3 qui produiront les quantités industrielles de l'anticorps monoclonal dans leur lait. Une telle technique est décrite par exemple dans le brevet EP 0 527 063.

Fc gamma récepteurs

Le CD16, appelé également Fc gamma récepteur de type III (Fc γ RIII), est un récepteur présent sur de nombreuses cellules du système immunitaire. Avec les CD32 (Fc γ RII) et CD64 (Fc γ RI), le CD16 est un récepteur spécifique des fragments constants (Fc) des chaînes lourdes des anticorps IgG. La liaison d'un complexe immun, via le Fc des IgG, à ces récepteurs CD16, CD32 et CD64 présent sur les cellules effectrices du système immunitaire déclenche l'activation de ces dernières et notamment la phagocytose du complexe immun.

Les cellules effectrices de l'invention expriment sur leur membrane cellulaire 3 types de récepteurs Fc: CD64, CD32 et CD16.

5 Le récepteur CD16 est appelé traditionnellement "récepteur de faible affinité", et est exprimé de manière constitutionnelle sur les PMNs (polymorphonuclear neutrophils), une sous-population de monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules Natural
10 Killer (cellules NK). Le CD16 participe à de multiples fonctions effectrices, par exemple la phagocytose, l'opsonisation de particules ou de complexes immuns, et l'activité ADCC.

15 L'anticorps monoclonal de l'ensemble de moyens de l'invention possède une région Fc présentant une forte affinité pour les récepteurs Fc présents sur les cellules effectrices de l'invention, et en particulier pour le CD16. L'invention décrit la synergie entre la région Fc des
20 anticorps monoclonaux de l'invention et le CD16 des cellules effectrices de l'ensemble de moyens. Cette affinité est telle que l'addition d'IgG plasmatiques polyvalentes humaine (constituant important du sang périphérique) dans le milieu contenant des anticorps et des cellules effectrices n'a pas ou
25 peu d'influence sur l'activité ADCC générée par l'association entre l'anticorps monoclonal et les cellules effectrices. Ceci est dû au fait que l'affinité de la région Fc de l'anticorps monoclonal pour le CD16 est supérieure à celle des IgG humaines présentes dans des conditions physiologiques. En
30 conséquence, l'activité ADCC observée *in vitro* ne sera pas diminuée *in vivo* suite à l'absence de déplacement de l'anticorps d'intérêt par les IgG sériques. En effet, le plasma et le sérum contiennent de fortes concentrations d'immunoglobulines polyvalentes (également appelées IgG
35 plasmatiques polyvalentes ou IgG polyclonales ou IgG sériques). L'anticorps monoclonal de l'ensemble de moyens induit l'activation des cellules effectrices via les

- 28 -

récepteurs Fc dont le CD16 et le CD64 conduisant à la lyse cellulaire par ADCC ou phagocytose. Il est maintenant communément admis que les IgG plasmatiques polyvalentes inhibent le mécanisme de lyse des cellules effectrices via le CD64, ce dernier étant saturé en présence d'IgG polyvalentes.

Le Demandeur a montré que, de manière surprenante, l'association dans un ensemble de moyens d'un anticorps monoclonal dont la région Fc présente une affinité pour le CD16 supérieure à celle des IgG isolées à partir de fractions plasmatiques, induit une activité ADCC qui n'est pas inhibée par l'addition IgG plasmatiques *in vitro*, ce qui permet donc d'envisager une conservation de l'activité thérapeutique *in vivo*. Cette activité thérapeutique *in vivo* correspond à la lyse des cellules tumorales, des cellules infectées par des agents pathogènes ou des cellules productrices d'auto-anticorps.

Ainsi, de manière avantageuse, l'anticorps monoclonal n'est pas déplacé par les IgG polyvalentes dans le cas de l'addition d'IgG plasmatiques humaines.

En raison de la forte affinité de la région Fc de l'anticorps pour le CD16, l'anticorps monoclonal lie les cellules effectrices, et cette liaison n'est pas déplacée par les IgG plasmatiques polyvalentes humaines, même à de fortes concentrations en sérum.

En conséquence, l'ensemble de moyens de l'invention permet une lyse optimale des cellules cibles même à de faibles concentrations de l'anticorps monoclonal.

Avantageusement, la concentration de l'anticorps monoclonal de l'ensemble de moyens est inférieure à la concentration d'un anticorps de même spécificité, utilisé traditionnellement en monothérapie, pour le traitement de pathologies malignes, de maladies auto-immunes ou infectieuses.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, la région Fc de l'anticorps monoclonal de l'invention possède une constante d'association au CD16 d'au moins 2.10^6 M^{-1} .

Avantageusement, la constante d'association de l'anticorps de l'invention est mesurée selon la méthode décrite dans le

document Maenaka et al. (Katsumi Maenaka, P. Anton van der Merwe, David I. Stuart, E. Yvonne Jones, and Peter Sondermann; The Human Low Affinity Fc γ receptors IIa, IIb and III Bind IgG with Fast Kinetics and Distinct Thermodynamic Properties. J. Biol. Chem., Vol. 276, Issue 48, 44898-44904, November 30, 2001).

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, la concentration en anticorps monoclonal dans l'ensemble de moyens est préférentiellement inférieure à 1 mg/200 millions de cellules.

L'utilisation de l'invention, ci dessus nommée ensemble de moyens, est envisagée dans des pathologies ou après injection le rapport effecteur/cible n'est pas nécessairement élevé, c'est à dire inférieur à 10, voire 1 ou 0.1.

Dans un aspect particulier de l'invention, l'anticorps monoclonal lie le CD16 de la cellule effectrice avec une affinité d'au moins $2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$.

Par exemple, l'anticorps monoclonal de l'invention peut être préparé au moyen du procédé décrit dans la demande de brevet WO 01/77181. Ce procédé de préparation d'un anticorps monoclonal capable d'activer les cellules effectrices exprimant le CD16, comprend les étapes suivantes:

a) purification d'anticorps monoclonaux obtenus à partir de différents clones provenant de lignées cellulaires sélectionnées parmi les hybridomes, notamment les hétérohybridomes et les lignées cellulaires animales ou humaines transfectées à l'aide d'un vecteur comportant le gène codant pour ledit anticorps;

b) addition de chaque anticorps obtenu à l'étape a) dans un mélange réactionnel distinct comprenant:

- i. les cellules cibles desdits anticorps,
- ii. des cellules effectrices comprenant des cellules exprimant le Fc γ RIII,
- iii. des IgG polyvalentes,

c) détermination du pourcentage de lyse des cellules cibles et sélection des anticorps monoclonaux qui activent les

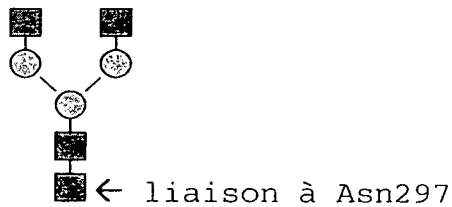
cellules effectrices provoquant une lyse significative des cellules cibles (activité ADCC dépendante du FcγRIII).

Pour chaque spécificité antigénique, l'anticorps monoclonal de l'invention est en réalité une composition contenant des anticorps monoclonaux, tous identiques au niveau de leur structure primaire car étant tous originaires d'un même clone cellulaire. Toutefois, tous les anticorps d'une composition d'anticorps monoclonaux ne présentent pas le même profil glycanique. Les anticorps humains et animaux possèdent un oligosaccharide lié en N sur le domaine CH₂ de chacune de leur chaîne lourde. Le site de liaison de cet oligosaccharide est, pour les immunoglobulines G, l'asparagine 297 (Asn 297 selon Kabat). Ce résidu asparagine est également appelé « site de glycosylation Fcγ ».

L'extrémité de la chaîne oligosaccharidique liée à l'Asn 297 est appelée « extrémité réductrice », tandis que l'extrémité opposée est appelée « extrémité non-réductrice ».

Dans la région Fc des anticorps de type IgG, il y a deux sites de glycosylation Fcγ; ainsi deux chaînes oligosaccharidiques sont liées à chaque molécule d'anticorps.

Ainsi, dans une composition d'anticorps monoclonaux, les chaînes oligosaccharidiques ont des structures variées, dépendantes de la glycosylation conférée par la lignée cellulaire productrice. Toutefois, ces chaînes ont une structure de base commune:

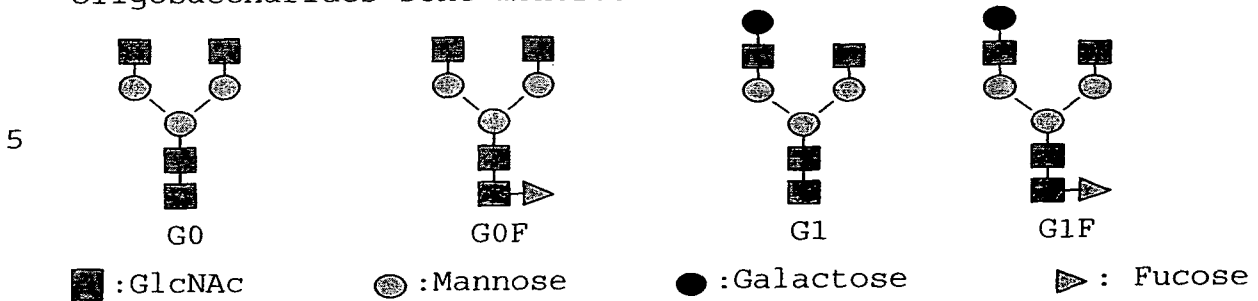


■ : GlcNAc

⊙ : Mannose

Cette structure de base, commune à tous les anticorps monoclonaux, peut comprendre en plus les sucres suivants: N-acétylglucosamine (GlcNAc), le fucose (fuc) et le galactose

(gal). Les principales formes glycosylées de N-oligosaccharides sont montrées ci-dessous:



10 Chaque chaîne oligosaccharidique pouvant inclure un ou plusieurs de ces sucres, et donc se présenter selon la forme G0, G0F, G1 ou G1F illustrées ci-dessus, il existe dans une composition d'anticorps monoclonaux une multitude de combinaisons d'oligosaccharides conférant à la composition d'anticorps monoclonaux un ratio en chacun de ces sucres qui

15 peut être différent d'une composition d'anticorps à l'autre. Ainsi, des clones provenant d'une même lignée cellulaire peuvent produire des compositions d'anticorps dont les compositions glycaniques varient.

20 Ainsi, il a été montré de manière surprenante par le Demandeur que les compositions d'anticorps monoclonaux dans lesquelles le taux de fucose est inférieur à 65% ont une forte affinité pour le CD16. Plus particulièrement, ce type de composition d'anticorps monoclonaux possède une affinité de leur région pour le CD16 qui est plus élevée que celle des IgG

25 polyvalentes pour le CD16. De plus, les anticorps monoclonaux de la composition ne sont pas déplacés par les Ig sériques.

30 Une méthode de préparation de telles compositions d'anticorps monoclonaux est donnée par exemple dans la demande de brevet WO 01/77181. Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, la composition d'anticorps monoclonaux est produite par une cellule possédant une faible activité enzymatique permettant l'addition du fucose au N-acétylglucosamine de l'extrémité réductrice, une telle enzyme étant de préférence la fucosyltransférase.

35 Dans un autre mode de réalisation de l'invention, il est possible de faire agir sur la composition d'anticorps monoclonaux une enzyme, par exemple la fucosidase, de manière

- 32 -

à obtenir une composition d'anticorps monoclonaux comportant un tel taux de fucose.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, la composition d'anticorps monoclonaux est produite dans YB2/0
5 (ATCC CRL-1662).

De manière avantageuse, l'anticorps monoclonal de l'ensemble de moyens de l'invention est dirigé contre l'antigène 5C5 (antigène tumoral exprimé par les cellules des carcinomes rénaux), le BCR (B Cell Receptor), un idiotype
10 comme celui des anticorps inhibiteurs anti-FVIII, le TCR (T Cell Receptor), CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD45, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD46, CD52, CD54, CD66 (a,b,c, d), CD74, CD80, CD86, CD126, CD138, CD154, , MUC1 (Mucine 1), MUC2 (Mucine 2), MUC3
15 (Mucine 3), MUC4 (Mucine 4), MUC16 (Mucine 16), HM1.24 (antigène spécifique des plasmocytes sur-exprimé dans les myélomes multiples), tenascin (protéine de la matrice extra-cellulaire), GGT (gamma-glutamyltranspeptidase), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), EGFR (Endothelial Growth
20 Factor receptor), CEA (carcinoembryonic antigen), CSAp (colon-specific antigen-p), ILGF (Insulin-Like Growth factor), placental growth factor, Her2/neu, anhydrase carbonique IX, IL-6, les protéines S100 (famille multigénique de protéines se liant au calcium), MART-1 (antigène tumoral de différenciation associé au mélanome), TRP-1 (tyrosinase related protein 1),
25 TRP-2 (tyrosinase related protein 2), gp100 (glycoprotéine 100 kDa), les protéines amyloïdes, l'antigène rhésus D, les molécules du CMH de classe I et II comme HLA-DR), un antigène résultant de l'expression de gènes mutés notamment des
30 oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur, un antigène dérivé de virus oncogènes exprimés par certaines tumeurs, un antigène ubiquitaire surexprimé dans certaines tumeurs et faiblement exprimés dans certains tissus normaux comme par exemple le récepteur de type II de l'hormone Müllérienne, une
35 protéine glycosylée ou pas, un phospholipide, une molécule du soi ou du non soi exprimée ou exposée à la membrane par les cellules infectées comme la phosphatidylsérine, et une

- 33 -

protéine exprimée ou sécrétée par un agent pathogène (toxine bactérienne, protéines complexes de la paroi bactérienne ou parasitaire, glycoprotéines d'enveloppe virale, par exemple de virus HIV, HBV, HCV, RSV, etc..), cette liste n'étant pas
5 limitative.

De manière préférentielle, l'anticorps de l'invention est dirigé contre le CD20.

L'antigène CD20 est une protéine transmembranaire hydrophobe d'un poids moléculaire de 35-37 kDa présente à la
10 surface des lymphocytes B matures (Valentine et al. 1987, Proc Natl Acad Sci U S A. 84(22):8085-9; Valentine et al. 1989, J.Biol. Chem. 264(19):11282-11287). Il est exprimé au cours du développement des lymphocytes B dès le stade pré-B précoce et ce jusqu'à la différenciation en plasmocyte, stade où cette
15 expression disparaît. L'antigène CD20 est présent à la fois sur les lymphocytes B normaux et sur les cellules B malignes. Plus particulièrement, l'antigène CD20 est exprimé sur la plupart des lymphomes de phénotype B (80% des lymphomes): il est exprimé par exemple sur plus de 90% des lymphomes non-
20 Hodgkiniens (NHL) de lymphocytes B, et sur plus de 95% des Leucémies Lymphoïdes Chroniques de type B (LLC-B). L'antigène CD20 n'est pas exprimé sur les cellules souches hématopoïétiques ni sur les plasmocytes.

La fonction du CD20 n'est pas encore totalement élucidée,
25 mais il pourrait agir comme un canal calcique et intervenir dans la régulation des premières étapes de la différenciation (Golay et al. 1985, J Immunol.; 135(6):3795-801) et de la prolifération (Tedder et al. 1986, Eur J Immunol. 1986 Aug; 16(8):881-7) des lymphocytes B.

30 Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, la composition d'anticorps anti-CD20 est produite par YB2/0 et possède un taux de fucose inférieur à 65%.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, un tel anticorps, et son procédé de production, sont décrits dans
35 la demande de brevet WO 2006/064121.

- 34 -

Avantageusement, la chaîne lourde d'un tel anticorps a pour séquence en acides aminés la séquence SEQ ID NO: 1.

Avantageusement, la chaîne légère d'un tel anticorps a pour séquence en acides aminés la séquence SEQ ID NO: 2 ou 3.

5 Brièvement, cet anticorps peut être obtenu, conformément à l'enseignement de la demande de brevet WO2006/064121, au moyen de la transfection de la cellule YB2/0 par des vecteurs permettant l'expression de la chaîne légère et de la chaîne lourde décrite ci-dessus.

10 Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, la composition d'anticorps monoclonal anti-CD20 possède un taux de fucose inférieur à 65%, et de préférence compris entre 20 et 40%, ou un ratio fucose/galactose inférieur à 0,6.

15 Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, l'anticorps monoclonal de l'ensemble de moyens est produit par le clone R509, déposé à la CNCM sous le numéro d'accèsion CNCM I-3314.

20 Dans un autre mode de réalisation préféré de l'invention, l'anticorps monoclonal de l'ensemble de moyens est produit par le clone R603, déposé à la CNCM sous le numéro d'accèsion CNCM I-3529..

25 Le Demandeur a montré que l'ensemble de moyens de l'invention est efficace pour le traitement de la LLC-B, car des cellules malignes de patients atteints de LLC-B ont été lysées ex vivo, et ceci même à un ratio inférieur ou égal à 10, voire à 5 ou même 2 E :T, à de faibles concentrations en anticorps, y compris en présence de sérum humain.

30 L'ensemble de moyens de l'invention permet ainsi la lyse optimale de la cible reconnue par les régions variables de l'anticorps, et ceci en raison des interactions (liaison) physique entre les cellules effectrices et la région Fc des anticorps, qui est suffisamment forte pour ne pas être déplacée par les IgG polyvalentes.

35 Avantageusement, la concentration en anticorps monoclonal contenue dans l'ensemble de moyens de l'invention pour le traitement de la LLC-B est inférieure à 375 mg/m².

En raison de ses avantages en terme de faible toxicité, de spécificité et de dose réduite, l'ensemble de moyens comprenant l'anticorps anti-CD20 peut être administré pour le traitement des pathologies suivantes: pathologies malignes avec un syndrome lymphoprolifératif des lymphocytes B CD20 positifs avec par exemple les lymphomes non-hodgkiniens de type B ou les leucémies B lymphoïdes aiguës ou chroniques, des maladies auto-immunes et/ou inflammatoires comme le rejet de greffe d'organes, la maladie du greffon contre l'hôte, la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé, la sclérodermie, le syndrome de Sjögren primitif (ou Syndrome de Gougerot-Sjögren), les polyneuropathies auto-immunes comme la sclérose en plaques, le diabète de type I, les hépatites auto-immunes, la spondylarthrite ankylosante, le syndrome de Reiter, l'arthrite de goutte, la maladie coeliaque, la maladie de Crohn, la thyroïdite d'Hashimoto, la maladie d'Addison, les hépatites auto-immunes, la maladie de Basedow, la colite ulcéreuse, les vascularites comme les vascularites systémiques associés aux ANCA (anticorps anti-cytoplasme des neutrophiles), les cytopénies auto-immunes et autres complications hématologiques de l'adulte et de l'enfant, telles que les thrombopénies auto-immunes aiguës ou chroniques, les anémies hémolytiques auto-immunes, la maladie hémolytique du nouveau-né (MHN), la maladie des agglutinines froides, le purpura thrombotique thrombocytopénique, l'hémophilie acquise auto-immune; le syndrome de Goodpasture, les néphropathies extra-membraneuses, les affections cutanées bulleuses auto-immunes, la myasthénie réfractaire, les cryoglobulinémies mixtes, le psoriasis, l'arthrite chronique juvénile, les myosites inflammatoires, les dermatomyosites ou les affections systémiques auto-immunes de l'enfant incluant le syndrome des antiphospholipides, cette liste n'étant pas limitative.

Avantageusement, l'ensemble de moyens de l'invention est une solution injectable. Avantageusement, cette solution injectable se trouve sous la forme d'une solution injectable localement ou par voie systémique. Dans un mode de réalisation

- 36 -

particulier, 6 administrations sont réalisées au patient. On effectue une administration par jour ou tous les deux jours pendant une semaine puis une fois par semaine pendant un mois ou deux, une administration trois fois/mois, cure pouvant être
5 renouvelée plusieurs fois.

Dans un mode de réalisation complémentaire, les cellules effectrices sont administrées à une dose comprise entre 10^4 et 10^9 cellules effectrices par injection.

Dans un autre mode de réalisation complémentaire, les anticorps de l'invention sont administrés à une dose comprise
10 entre 1 et 500 mg d'anticorps par injection.

Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, les cellules effectrices sont administrées de manière répétée jusqu'à 10 fois, l'intervalle de temps entre chaque administration étant compris entre 2 jours et 12 mois.
15 Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, l'anticorps monoclonal est administré de manières répétées jusqu'à 10 fois, l'intervalle de temps entre chaque administration étant compris entre 2 jours et 12 mois. Dans un
20 autre mode de réalisation de l'invention, l'anticorps monoclonal et les cellules effectrices sont administrés de manière simultanée.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, l'anticorps monoclonal et les cellules effectrices sont administrés de manière séquentielle, l'anticorps monoclonal
25 étant administré avant les cellules effectrices.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, l'anticorps monoclonal et les cellules effectrices sont administrés de manière séquentielle, l'anticorps monoclonal
30 étant administré après les cellules effectrices.

Un autre objet de l'invention est une composition pharmaceutique comprenant l'ensemble de moyens de l'invention.

Un autre objet de l'invention se rapporte à l'utilisation de l'ensemble de moyens de l'invention pour la préparation
35 d'un médicament destiné au traitement des pathologies malignes, auto-immunes et infectieuses.

- 37 -

Ce médicament ou composition pharmaceutique comprend avantageusement un excipient et/ou un véhicule pharmaceutiquement acceptables.

L'excipient peut être toute solution, telle qu'une solution
5 saline, physiologique, isotonique, tamponnée, etc., ainsi que toute suspension, gel, poudre, etc., compatible avec un usage pharmaceutique et connu de l'homme du métier. Les compositions selon l'invention peuvent en outre contenir un ou plusieurs agents ou véhicules choisis parmi les dispersants,
10 solubilisants, stabilisants, tensioactifs, conservateurs, etc. D'autre part, les compositions selon l'invention peuvent comprendre d'autres agents ou principes actifs.

Un autre objet de l'invention est l'utilisation de
15 l'ensemble de moyens de l'invention pour la fabrication d'un médicament.

Un autre objet de l'invention est l'utilisation de l'ensemble de moyens de l'invention pour la fabrication d'un
20 médicament destiné au traitement d'une pathologie maligne.

Avantageusement, cette pathologie maligne est choisie parmi les tumeurs solides et les hémopathies malignes. Les tumeurs solides sont sélectionnées parmi les mélanomes, les
25 carcinomes, les sarcomes, les gliomes et les cancers cutanés. Les carcinomes sont sélectionnés dans le groupe constitué par les carcinomes du rein, du sein, de la cavité orale, des poumons, du tractus gastro-intestinal, des ovaires, de la prostate, de l'utérus, de la vessie, du pancréas, du foie, de
30 la vésicule biliaire, de la peau et des testicules.

Les hémopathies malignes sont sélectionnées parmi les syndromes lymphoprolifératifs, myéloprolifératifs, myélodysplasiques et les leucémies myéloïdes aiguës avec par exemple les lymphomes non-hodgkiniens de type B, les leucémies
35 B lymphoïdes aiguës ou chroniques, le lymphome de Burkitt, la leucémie à tricholeucocytes, les leucémies myéloïdes aiguës et chroniques, les lymphomes et les leucémies T, lymphomes

- 38 -

Hodgkiniens, la macroglobulinémie de Waldenström et les myélomes multiples, cette liste n'étant pas limitative.

Un autre objet de l'invention est l'utilisation de l'ensemble de moyens de l'invention pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement d'une maladie auto-immune et/ou inflammatoire primitive ou secondaire, spécifique d'organes ou systémiques et associée ou non à des auto-anticorps pathogènes, choisie parmi le rejet de greffe d'organes, la maladie du greffon contre l'hôte, la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé, la sclérodermie, le syndrome de Sjögren primitif (ou Syndrome de Gougerot-Sjögren), les polyneuropathies auto-immunes comme la sclérose en plaques, le diabète de type I, les hépatites auto-immunes, la spondylarthrite ankylosante, le syndrome de Reiter, l'arthrite de goutte, la maladie coeliaque, la maladie de Crohn, la thyroïdite d'Hashimoto, la maladie d'Addison, les hépatites auto-immunes, la maladie de Basedow, la colite ulcéraire, les vascularites comme les vascularites systémiques associés aux ANCA (anticorps anti-cytoplasme des neutrophiles), les cytopénies auto-immunes et autres complications hématologiques de l'adulte et de l'enfant, telles que les thrombopénies auto-immunes aiguës ou chroniques, les anémies hémolytiques auto-immunes, la maladie hémolytique du nouveau-né (MHN), la maladie des agglutinines froides, le purpura thrombotique thrombocytopénique, l'hémophilie acquise auto-immune; le syndrome de Goodpasture, les néphropathies extra-membraneuses, les affections cutanées bulleuses auto-immunes, la myasthénie réfractaire, les cryoglobulinémies mixtes, le psoriasis, l'arthrite chronique juvénile, les myosites inflammatoires, les dermatomyosites et les affections systémiques auto-immunes de l'enfant incluant le syndrome des antiphospholipides, cette liste n'étant pas limitative.

35

- 39 -

Un autre objet de l'invention est l'utilisation de l'ensemble de moyens de l'invention pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement d'une maladie infectieuse.

Avantageusement, cette maladie infectieuse est choisie
5 parmi celles induites par les virus (virus de l'immunodéficience humaine ou VIH, virus de l'hépatite B ou C (HBV, HCV), virus Epstein-Barr ou EBV, cytomégalovirus ou CMV, les entérovirus, la grippe avec les virus Influenza A, B et C, le virus respiratoire syncytial ou VRS, Human T cell
10 Lymphotropic Virus ou HTLV), les bactéries et/ou leurs toxines (tétanos, diphtérie, pneumocoques, méningocoques, staphylocoques y compris les formes méthiciline résistantes, les Klebsielles, les Shigelles, les pseudomonas aeruginosa, les entérobactéries ou les pathologies résistantes aux
15 antibiotiques dont les maladies nosocomiales), les parasites (paludisme, leishmanioses, trypanosomiasés) ainsi que les maladies émergentes par exemple le Chikungunya, la grippe aviaire, le virus du syndrome respiratoire aigu sévère ou SRAS, le virus responsables de fièvres hémorragiques comme
20 Ebola ou Dengue ou le virus du Nil occidental, et celles reliées au bio-terrorisme comme le Charbon, le Botulisme, la Peste, la Variole et poxvirus, la Tularémie, les Agents des fièvres hémorragiques, la Brucellose, les Entérotoxines B du Staphylocoque, la Toxine diphtérique ou les Encéphalites
25 virales, cette liste n'étant pas limitative.

D'autres aspects et avantages de l'invention seront décrits dans les exemples qui suivent, qui doivent être considérés
30 comme illustratifs et ne limitent pas l'étendue de l'invention.

Figures

Figure 1: Etude de la fixation des anticorps EMABling anti-D R297 et de l'anticorps AD1 au CD16 des macrophages (récepteur
35 FcγRIII) par un test de compétition.

- 40 -

Figure 2: Activité ADCC des anticorps EMABling R297 et de l'anticorps AD1 induite par les macrophages en présence de différentes concentrations d'immunoglobulines polyclonales (IVIg).

5

Figure 3: Activité ADCC des anticorps EMABling R297 et de l'anticorps AD1 induite par les macrophages en présence de différentes concentrations d'immunoglobulines (IVIg) et de l'anticorps anti-CD16 3G8 à la concentration de 6,25 µg/ml.

10

Figure 4: Phagocytose des hématies Rh+ par les macrophages CD16+ induite par les anticorps EMABling R297 et de l'anticorps AD1 en présence de différentes concentrations d'immunoglobulines (IVIg).

15

Exemples

Exemple 1: Différenciation des monocytes en macrophages

Les monocytes sont isolés à partir de sang périphérique par fractionnement sur gradient de densité Ficoll et Percoll puis mis en culture dans un milieu RPMI contenant 10% SVF et additionné de M-CSF (Monocyte Colony Stimulating Factors) (50 ng/ml). Après 7 jours, les macrophages obtenus sont de phénotype CD14+, CD16+, CD32+, CD64+, CD11b+, CD1a-, CD80-, CD83-.

Ainsi, la différenciation en M-CSF permet l'expression du CD16 à la surface des macrophages.

Exemple 2: Interaction des anticorps anti-D avec le CD16 exprimé par les macrophages

La fixation de l'anticorps anti-D R297 (appelé également « EMABling R297 ») est comparée à celle de l'anticorps AD1. L'anticorps anti-D R297 est décrit dans le document WO 01/77181, et est produit conformément au procédé décrit dans ce document. Cet anticorps est produit dans la cellule YB2/0 (ATCC CRL-1662).

35

- 41 -

La fixation de l'anticorps R297 sur le CD16 des macrophages est comparée à celle de l'anticorps AD1 (décrit dans le document WO 01/77181, exprimé par un hétéromyélome).

5 Le test de déplacement de l'anticorps anti-CD16 (clone producteur 3G8) permet de mesurer la fixation des anticorps monoclonaux sur le récepteur CD16 des macrophages, quelle que soit leur spécificité.

10 Les macrophages purifiés sont incubés avec des concentrations variables (0 à 83 $\mu\text{g/ml}$) d'anticorps anti-D (R297 ou AD1) et l'anticorps anti-CD16 3G8 couplé à un fluorochrome (3G8-PE) à concentration fixe.

15 Après lavage, la fixation de l'anticorps 3G8-PE sur le récepteur CD16 des macrophages est évaluée par cytométrie en flux. Les anticorps ayant la capacité de se fixer sur le CD16, entrent en compétition avec la fixation de l'anticorps 3G8 et, par conséquent, induisent une diminution de la MFI (Mean Fluorescence Intensity ou moyenne de l'intensité de fluorescence). Les résultats sont exprimés en moyennes de 20 fluorescence (MFI), en fonction de la quantité des anticorps à évaluer.

La figure 1 montre que l'anticorps R297 se fixe très fortement sur le CD16 des macrophages par rapport à 25 l'anticorps AD1.

Au plateau l'anticorps EMABling induit un déplacement au moins 6 fois plus important que l'anticorps AD1.

30 **Exemple 3: Interaction des anticorps anti-CD20 EMAB6 et EMAB603 avec le CD16 exprimé par les macrophages**

La fixation des anticorps anti-CD20 EMAB603 (produit par le clone R603, déposé à la CNCM sous le numéro I-3529) et EMAB6 (produit par le clone R509, déposé à la CNCM sous le numéro I-3314) sur le CD16 des macrophages est comparée à celle de 35 Rituxan. Les anticorps anti-CD20 EMAB6 et EMAB603 sont produits conformément au procédé décrit dans la demande de brevet WO2006/064121, en particulier pages 26-33. Par

- 42 -

ailleurs, les clones produisant ces anticorps sont disponibles à la CNCM sous les numéros d'accès CNCM I-3314 et CNCM I-3529 respectivement.

5 Le test de déplacement de l'anticorps anti-CD16 (clone producteur 3G8) permet de mesurer la fixation des anticorps monoclonaux sur le récepteur CD16, quelle que soit leur spécificité.

10 Les macrophages sont incubés avec des concentrations variables (0 à 83 µg/ml) d'anticorps anti-CD20 (EMAB6, EMAB603 ou rituximab) et l'anticorps anti-CD16 3G8 couplé à un fluorochrome (3G8-PE) à concentration fixe.

Après lavage, la fixation de l'anticorps 3G8-PE sur le récepteur CD16 des macrophages est évaluée par cytométrie en flux. Les anticorps ayant la capacité de se fixer sur le CD16, entrent en compétition avec la fixation de l'anticorps 3G8 et, par conséquent, induisent une diminution de la MFI (Mean Fluorescence Intensity ou moyenne de l'intensité de fluorescence). Les résultats sont exprimés en moyennes de fluorescence (MFI), en fonction de la quantité des anticorps à évaluer.

25 Les valeurs I_{max} (inhibition maximale de la fixation de 3G8) et IC_{50} (concentration d'anticorps anti-CD20 requise pour induire une inhibition de fixation de 3G8 de 50% de I_{max}) sont calculées à l'aide du logiciel d'analyses statistiques PRISM.

Résultat:

30 L'interaction des anticorps EMAB6 et EMAB6 sur le CD16 des macrophages est très supérieure à celle obtenue avec Rituxan.

Ainsi, ce test étant établi en absence de cible antigénique, les anticorps anti-CD20 de l'invention ont la capacité de se fixer fortement sur le CD16 des macrophages.

35

Exemple 4: Activité ADCC anti-D/hématies Rh+/macrophages. Rôle des IVIg polyvalentes (Tégéline®).

- 43 -

La capacité cytotoxique des anticorps anti-D est étudiée par la technique ADCC. Les anticorps anti-D, les macrophages (monocytes différenciés en M-CSF) et des hématies Rhésus D+ (rapport effecteur/cible d'environ 2/1) sont incubés 16h à 37°C en présence de différentes concentrations d'immunoglobulines (IVIg) polyvalentes (Tégéline®). L'activité cytotoxique induite par les anticorps est ensuite mesurée par colorimétrie en quantifiant dans les surnageants l'hémoglobine libérée par les hématies lysées. Les résultats de lyse spécifique sont exprimés en pourcentage de lyse.

Les résultats de la figure 2 indiquent qu'en présence de macrophages, l'anticorps EMABling R297 a une forte activité ADCC qui subsiste en présence de concentrations importantes d'IVIg, contrairement à l'anticorps AD1 qui induit une lyse par ADCC uniquement en absence d'IVIg.

Ainsi, en l'absence d'immunoglobulines polyvalentes, les deux anticorps anti-D, EMABling R297 et AD1 ont une activité ADCC de l'ordre de 29%. Par contre à la concentration de 5 mg/ml d'immunoglobulines polyvalentes, l'anticorps EMABling apparaît au moins 20 fois plus actif (23% de lyse pour 1% avec AD1). Cet avantage subsiste à de plus fortes concentrations d'immunoglobulines polyvalentes (25 mg/ml), les pourcentages de lyse respectifs pour l'anticorps EMABling et AD1 étant de 16 et 1%.

Exemple 5: Activité ADCC anti-D/hématies Rh+/macrophages. Rôle des IVIg polyvalentes (Tégéline®).

Selon le même protocole que décrit dans l'exemple 4, l'activité ADCC des anti-CD20 en présence de cellules Raji et de macrophages (monocytes différenciés en M-CSF) a également été étudiée. Les anticorps anti-CD20 (produit par le clone R603 ou Rituxan) sont incubées en présence de macrophages, de cellules Raji et de différentes concentrations d'IVIg polyvalentes (Tégéline®). Après 16h d'incubation à 37°C, l'activité ADCC induite par les anticorps est mesurée par

- 44 -

colorimétrie en quantifiant dans les surnageants la quantité de LDH (lactate deshydrogénase) intracellulaire libérée par les cellules Raji. Les résultats de lyse spécifique sont exprimés en pourcentage de lyse.

5

Les résultats indiquent que l'anticorps anti-CD20 R603 a une activité ADCC au minimum 2 fois supérieure à celle induite par Rituxan en présence de macrophages exprimant le CD16 et de Tégéline®. Cette activité ADCC est dépendante du CD16 exprimé par les macrophages comme démontré par l'effet inhibiteur de l'anti-CD16 3G8.

Exemple 6: Activité ADCC anti-D/hématies Rh+/macrophages. Mise en évidence du CD16 en présence d'IVIg

15 L'addition d'anticorps anti-CD16, 3G8, inhibe l'ADCC induite par l'anticorps EMABling en présence de la plus forte concentration d'IVIg testée, indiquant que la lyse induite est dépendante du CD16 exprimé sur les macrophages (figure 3).

20 **Exemple 7: Phagocytose des hématies Rhésus + par les macrophages CD16+ induite par l'anticorps EMABling R297 en présence d'IVIg.**

La capacité des anticorps anti-D R297 à induire une phagocytose des hématies Rhésus + par des macrophages CD16+ est étudiée par cytométrie en flux. Les anticorps anti-D, les macrophages marqués au PKH67 (monocytes différenciés M-CSF et des hématies Rhésus D+ (rapport effecteur/cible de 5/1) marquées au PKH26 sont incubées 3h à 4°C et 37°C en présence de différentes concentrations d'IVIg polyvalentes (Tégéline®).

30 Les résultats correspondent au pourcentage de macrophages doublement marqués PKH67/PKH26, c'est à dire ayant phagocyté au moins une hématie.

Résultats:

35 A 4°C, les macrophages et hématies apparaissent dans des fenêtres différentes en cytométrie, chacune étant marquée par un fluorochrome spécifique. Le pourcentage de phagocytose est

- 45 -

très faible, de l'ordre de 4% en absence d'IVIg, et de 1 à 2% en présence d'IVIg. Ces valeurs à 4°C sont systématiquement déduites pour exprimer le pourcentage de phagocytose à 37°C.

5 A 37°C, le pourcentage de macrophages doublement marqués PKH67/PKH26 augmente en absence d'IVIg pour les deux anticorps testés, R297 EMABling et AD1. En présence d'IVIg, seul l'anticorps EMABling a la capacité de phagocyter les hématies Rh+ contrairement à l'anticorps AD1. Ainsi, que ce soit à 0, 1 ou 2 mg/ml d'IVIg, le pourcentage de phagocytose reste compris
10 entre 15 et 20%, montrant que l'ajout d'IVIg n'inhibe pas la phagocytose induite par l'anticorps EMABling.

A la concentration de 1 mg/ml, l'anticorps EMABling est au moins 5 fois supérieur à l'anticorps AD1. A la concentration
15 supérieure de 2 mg/ml, le pourcentage de phagocytose est de 16.9% avec l'anticorps EMABling et non significatif (valeur 0) avec l'anticorps AD1.

**Exemple 8: Phagocytose des hématies Rhésus + par les
20 macrophages CD16+ induite par l'anticorps R603 en présence d'IVIg.**

La phagocytose des cellules Raji CD20 en présence de macrophages CD16, induite par l'anticorps R603 en présence
25 d'IVIg a également été étudiée.

La capacité des anticorps anti-CD20 à induire une phagocytose des cellules Raji par des macrophages CD16+ est étudiée par cytométrie en flux. Les anticorps anti-CD20, les macrophages marqués au PKH67 (monocytes différenciés M-CSF) et
30 les cellules Raji (rapport effecteur/cible de 5/1, 10/1 et 20/1) marquées au PKH26 sont incubées 3h à 4°C et 37°C en présence de différentes concentrations d'IVIg polyvalentes (Tégéline®).

Les résultats correspondent au pourcentage de macrophages doublement marqués PKH67/PKH26, c'est à dire ayant phagocyté
35 au moins une cellule Raji.

Résultats:

- 46 -

A 4°C, les macrophages et cellules Raji apparaissent dans des fenêtres différentes en cytométrie, chacune étant marquée par un fluorochrome spécifique. Le pourcentage de phagocytose est très faible, inférieur à 5% en absence et en présence
5 d'IVIg. Ces valeurs à 4°C sont systématiquement déduites pour exprimer le pourcentage de phagocytose à 37°C.

A 37°C, le pourcentage de macrophages doublement marqués PKH67/PKH26 augmente en absence d'IVIg pour les deux anticorps testés, R603 anti-CD20 et Rituxan. En présence d'IVIg,
10 l'anticorps EMABling a une capacité supérieure, de l'ordre de 2 fois, 4 fois, voire 10 fois de phagocyter les cellules Raji par rapport à l'anticorps Rituxan. Ainsi, que ce soit à 0; 1 ou 2 mg/ml d'IVIg, le pourcentage de phagocytose reste toujours supérieur à celui induit par Rituxan, montrant qu'en
15 présence d'IVIg, l'anticorps EMABling induit une phagocytose en présence de macrophages CD16+.

REVENDICATIONS

1. Ensemble de moyens pour le traitement d'une pathologie maligne, d'une maladie auto-immune ou d'une maladie infectieuse, comprenant une cellule effectrice qui exprime le récepteur Fc γ RIII (CD16) à sa surface, et un anticorps monoclonal, dans lequel l'affinité de la région Fc dudit anticorps monoclonal pour le CD16 est supérieure à l'affinité de la région Fc des immunoglobulines polyclonales pour le CD16.
2. Ensemble de moyens selon la revendication 1, dans lequel ladite cellule effectrice qui exprime le récepteur Fc γ RIII (CD16) à sa surface est un monocyte ou une cellule dérivée de monocyte ou d'un précurseur de monocyte qui exprime le récepteur Fc γ RIII (CD16) à sa surface.
3. Ensemble de moyens selon la revendication 1 ou 2, dans lequel ladite cellule dérivée de monocyte ou d'un précurseur de monocyte qui exprime le CD16 à sa surface est choisie parmi les monocytes exprimant le CD16, les macrophages, les cellules Natural Killer (NK), les cellules dendritiques et l'ensemble des cellules mononucléées du sang périphérique (Peripheral Blood Mononuclear Cell ou PBMC).
4. Ensemble de moyens selon la revendication 3, dans lequel ladite cellule, dérivée de monocyte ou d'un précurseur de monocyte, qui exprime le CD16 à sa surface est un macrophage.
5. Ensemble de moyens selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ledit anticorps monoclonal n'est pas déplacé par les immunoglobulines polyclonales, particulièrement celles présentes dans le sérum humain, ceci en raison de ladite affinité de la région Fc dudit anticorps monoclonal pour le CD16.

6. Ensemble de moyens selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ledit anticorps monoclonal lie le CD16 de ladite cellule dérivée de monocyte ou d'un précurseur de monocyte avec une affinité supérieure à $2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$.
7. Ensemble de moyens selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ledit anticorps monoclonal est produit sous forme d'une composition d'anticorps monoclonaux, dans laquelle chaque anticorps possède des chaînes de sucre liées en N au site de glycosylation Fc γ (asparagine 297, selon Kabat), et dans laquelle parmi toutes les chaînes de sucre liées en N audit site de glycosylation de tous les anticorps de ladite composition, le taux de fucose est inférieur à 65%.
8. Ensemble de moyens selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ledit anticorps monoclonal est dirigé contre un antigène sélectionné parmi l'antigène 5C5 (antigène tumoral exprimé par les cellules des carcinomes rénaux), le BCR (B Cell Receptor), un idiotype comme celui des anticorps inhibiteurs anti-FVIII, le TCR (T Cell Receptor), CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD45, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD46, CD52, CD54, CD66 (a,b,c, d), CD74, CD80, CD86, CD126, CD138, CD154, MUC1 (Mucine 1), MUC2 (Mucine 2), MUC3 (Mucine 3), MUC4 (Mucine 4), MUC16 (Mucine 16), HM1.24 (antigène spécifique des plasmocytes sur-exprimé dans les myélomes multiples), tenascin (protéine de la matrice extra-cellulaire), GGT (gamma-glutamyltranspeptidase), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), EGFR (Endothelial Growth Factor receptor), CEA (carcinoembryonic antigen), CSAp (colon-specific antigen-p), ILGF (Insulin-Like Growth factor), placental growth factor, Her2/neu, anhydrase carbonique IX, IL-6, les protéines S100 (famille multigénique de protéines se liant

- 49 -

5 au calcium), MART-1 (antigène tumoral de différenciation associé au mélanome), TRP-1 (tyrosinase related protein 1), TRP-2 (tyrosinase related protein 2), gp100 (glycoprotéine 100 kDa), les protéines amyloïdes, l'antigène rhésus D, les
10 molécules du CMH de classe I et II comme HLA-DR), un antigène résultant de l'expression de gènes mutés notamment des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur, un antigène dérivé de virus oncogènes exprimés par certaines tumeurs bien définies, un antigène ubiquitaire surexprimé
15 dans certaines tumeurs et faiblement exprimés dans certains tissus normaux comme par exemple le récepteur de type II de l'hormone Müllérienne, une protéine glycosylée ou pas, un phospholipide, une molécule du soi ou du non soi exprimée ou exposée à la membrane par les cellules infectées comme la phosphatidylsérine, et une protéine exprimée ou sécrétée
20 par un agent pathogène (toxine bactérienne, les protéines complexes de la paroi bactérienne ou parasitaire, les glycoprotéines d'enveloppe virale, par exemple de virus HIV, HBV, HCV et RSV).

20

9. Ensemble de moyens selon la revendication 8, dans lequel ledit anticorps monoclonal est dirigé contre le CD20.

25 10. Ensemble de moyens selon la revendication 9, dans lequel ledit anticorps anti-CD20 est produit par la lignée cellulaire R509 déposée à la CNCM sous le numéro d'accèsion I-3314, ou par la lignée cellulaire R603, déposée à la CNCM sous le numéro d'accèsion I-3529.

30 11. Ensemble de moyens selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour une utilisation en thérapie de manière simultanée, séquentielle ou séparée.

35 12. Ensemble de moyens selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ladite cellule effectrice exprimant le CD16 à sa surface a une activité

- 50 -

cytotoxique sur la cellule cible dudit anticorps favorisée par l'interaction de l'anticorps avec le CD16.

- 5 13. Ensemble de moyens selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ledit anticorps monoclonal induit une cytotoxicité par activité ADCC ou par phagocytose de ladite cellule cible de l'anticorps en présence d'une cellule effectrice exprimant le CD16.
- 10 14. Composition pharmaceutique contenant un ensemble de moyens tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, et des excipients pharmaceutiquement acceptables.
- 15 15. Utilisation d'un ensemble de moyens tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, pour la fabrication d'un médicament.
- 20 16. Utilisation d'un ensemble de moyens tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement d'une pathologie maligne.
- 25 17. Utilisation d'un ensemble de moyens selon la revendication 16, pour le traitement d'une pathologie maligne choisie parmi les tumeurs solides et les hémopathies malignes.
- 30 18. Utilisation d'un ensemble de moyens selon la revendication 17, dans laquelle les tumeurs solides sont sélectionnées parmi les mélanomes, les carcinomes, les sarcomes, les gliomes et les cancers cutanés.
- 35 19. Utilisation d'un ensemble de moyens selon la revendication 18, dans laquelle les carcinomes sont sélectionnés dans le groupe constitué par les carcinomes du rein, du sein, de la cavité orale, des poumons, du tractus gastro-intestinal, des ovaires, de la prostate, de l'utérus, de la vessie, du

- 51 -

pancréas, du foie, de la vésicule biliaire, de la peau et des testicules.

20. Utilisation d'un ensemble de moyens selon la revendication
5 17, dans laquelle les hémopathies malignes sont sélectionnées parmi les syndromes lymphoprolifératifs, myéloprolifératifs, myélodysplasiques et les leucémies myéloïdes aiguës avec les lymphomes non-hodgkiniens de type B, les leucémies B lymphoïdes aiguës ou chroniques, le
10 lymphome de Burkitt, la leucémie à tricholeucocytes, les leucémies myéloïdes aiguës et chroniques, les lymphomes et les leucémies T, lymphomes Hodgkiniens, la macroglobulinémie de Waldenström et les myélomes multiples.
- 15 21. Utilisation d'un ensemble de moyens tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement d'une maladie auto-immune et/ou inflammatoire primitive ou
20 secondaire, spécifique d'organes ou systémiques et associée ou non à des auto-anticorps pathogènes.
22. Utilisation d'un ensemble de moyens selon la revendication
25 21, pour le traitement d'une maladie auto-immune et/ou inflammatoire primitive ou secondaire, spécifique d'organes ou systémiques et associée ou non à des auto-anticorps pathogènes, choisie parmi le rejet de greffe d'organes, la maladie du greffon contre l'hôte, la polyarthrite
30 rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé, la sclérodermie, le syndrome de Sjögren primitif (ou Syndrome de Gougerot-Sjögren), les polyneuropathies auto-immunes comme la sclérose en plaques, le diabète de type I, les hépatites auto-immunes, la spondylarthrite ankylosante, le
35 syndrome de Reiter, l'arthrite de goutte, la maladie coeliaque, la maladie de Crohn, la thyroïdite d'Hashimoto, la maladie d'Addison, les hépatites auto-immunes, la maladie de Basedow, la colite ulcéreuse, les vascularites comme les vascularites systémiques associés aux ANCA

- 52 -

- (anticorps anti-cytoplasme des neutrophiles), les cytopénies auto-immunes et autres complications hématologiques de l'adulte et de l'enfant, telles que les thrombopénies auto-immunes aiguës ou chroniques, les anémies hémolytiques auto-immunes, la maladie hémolytique du nouveau-né (MHN), la maladie des agglutinines froides, le purpura thrombotique thrombocytopénique et l'hémophilie acquise auto-immune; le syndrome de Goodpasture, les néphropathies extra-membraneuses, les affections cutanées bulleuses auto-immunes, la myasthénie réfractaire, les cryoglobulinémies mixtes, le psoriasis, l'arthrite chronique juvénile, les myosites inflammatoires, les dermatomyosites et les affections systémiques auto-immunes de l'enfant incluant le syndrome des antiphospholipides.
23. Utilisation d'un ensemble de moyens tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 13, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement d'une maladie infectieuse.
24. Utilisation d'un ensemble de moyens selon la revendication 23, pour le traitement d'une maladie infectieuse choisie parmi celles induites par les virus (virus de l'immunodéficience humaine ou VIH, virus de l'hépatite B ou C (HBV, HCV), virus Epstein-Barr ou EBV, cytomégalovirus ou CMV, les entérovirus, la grippe avec les virus Influenza A, B et C, le virus respiratoire syncytial ou VRS, Human T cell Lymphotropic Virus ou HTLV), les bactéries et/ou leurs toxines (tétanos, diphtérie, pneumocoques, méningocoques, staphylocoques y compris les formes méthiciline résistantes, les Klebsielles, les Shigelles, les pseudomonas aeruginosa, les entérobactéries ou les pathologies résistantes aux antibiotiques dont les maladies nosocomiales), les parasites (paludisme, leishmanioses, trypanosomiasés) ainsi que les maladies émergentes par exemple le Chikungunya, la grippe aviaire, le virus du syndrome respiratoire aigu sévère ou SRAS, les virus

- 53 -

responsables de fièvres hémorragiques comme Ebola ou Dengue
ou le virus du Nil occidental, et celles reliées au bio-
terrorisme comme le Charbon, le Botulisme, la Peste, la
Variole et poxvirus, la Tularémie, les Agents des fièvres
5 hémorragiques, la Brucellose, les Entérotoxines B du
Staphylocoque, la Toxine diphtérique ou les Encéphalites
virales.

Fig. 1

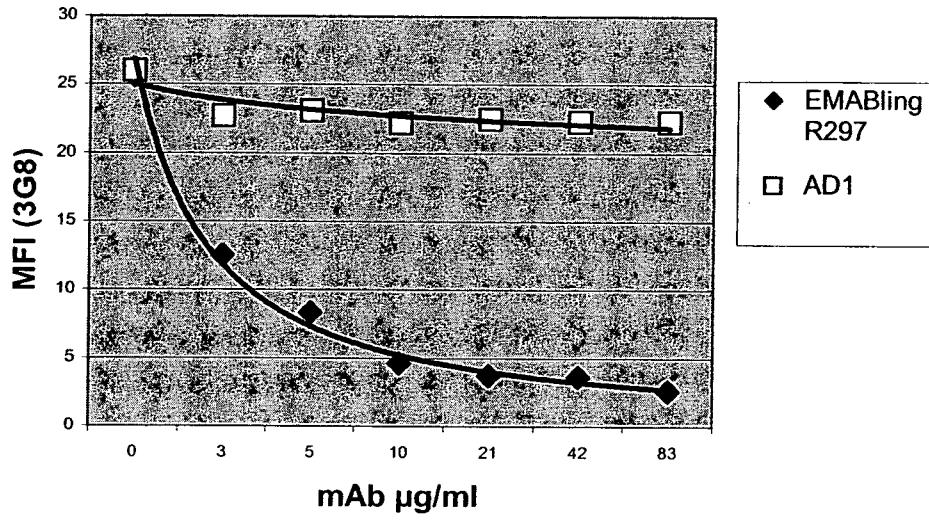


Fig. 2

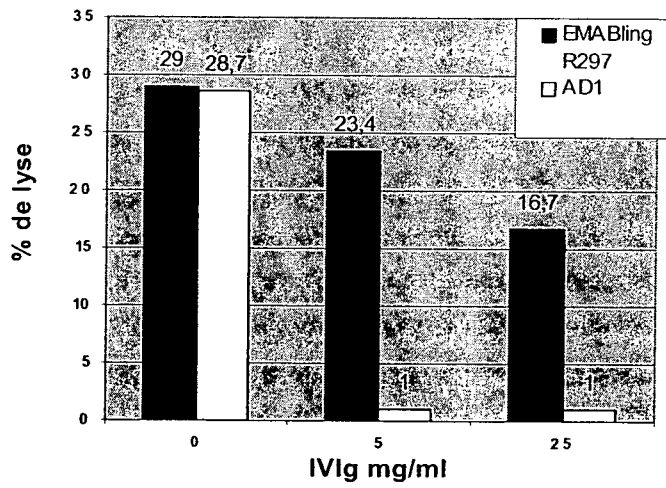


Fig. 3

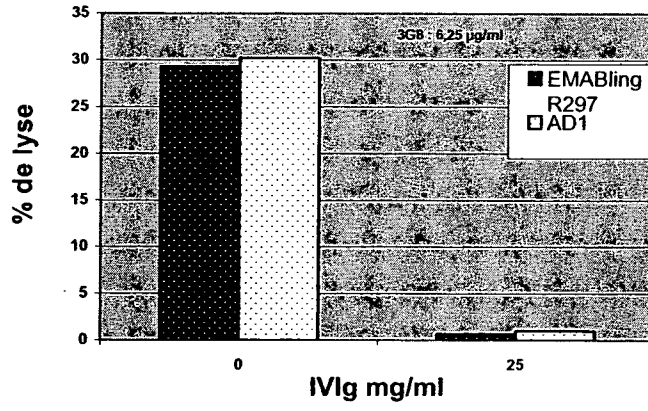
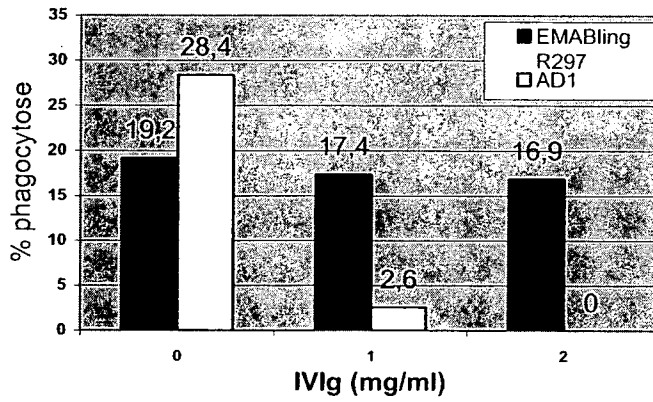


Fig. 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2008/000598

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. A61K39/395 A61K35/14

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 C07K A61K

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, PAJ, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>LEFEBVRE M L ET AL: "Ex vivo-activated human macrophages kill chronic lymphocytic leukemia cells in the presence of rituximab: mechanism of antibody-dependent cellular cytotoxicity and impact of human serum" JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, HAGERSTOWN, MD, US, vol. 29, no. 4, July 2006 (2006-07), pages 388-397, XP008083749 ISSN: 1524-9557 the whole document</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	1-24

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier 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

31 octobre 2008

Date of mailing of the international search report

07/11/2008

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Hermann, Patrice

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2008/000598

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CARTRON G ET AL: "Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPANY, ORLANDO, FL, US, vol. 99, no. 3, 1 February 2002 (2002-02-01), pages 754-758, XP002404674 ISSN: 0006-4971 the whole document	1-24
A	WO 2005/040217 A (UNIV CAMBRIDGE TECH [GB]; ARMOUR KATHRYN LESLEY [GB]; CLARK MICHAEL RO) 6 May 2005 (2005-05-06) the whole document	1-24
A	MANCHES OLIVIER ET AL: "In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPANY, ORLANDO, FL, US, vol. 101, no. 3, 1 February 2003 (2003-02-01), pages 949-954, XP002451263 ISSN: 0006-4971 the whole document	1-24
A	MUNN D H ET AL: "ROLE OF LOW-AFFINITY FC RECEPTORS IN ANTIBODY-DEPENDENT TUMOR CELL PHAGOCYTOSIS BY HUMAN MONOCYTE-DERIVED MACROPHAGES" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 51, 15 February 1991 (1991-02-15), pages 1117-1123, XP000918925 ISSN: 0008-5472 the whole document	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2008/000598

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005040217 A	06-05-2005	AU 2004283135 A1	06-05-2005
		CA 2541868 A1	06-05-2005
		EP 1673392 A2	28-06-2006
		US 2007041966 A1	22-02-2007
		US 2005215768 A1	29-09-2005

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2008/000598

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
 INV. A61K39/395 A61K35/14

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

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
 C07K A61K

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	LEFEBVRE M L ET AL: "Ex vivo-activated human macrophages kill chronic lymphocytic leukemia cells in the presence of rituximab: mechanism of antibody-dependent cellular cytotoxicity and impact of human serum" JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, HAGERSTOWN, MD, US, vol. 29, no. 4, juillet 2006 (2006-07), pages 388-397, XP008083749 ISSN: 1524-9557 le document en entier	1-24
	----- -/--	

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

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

31 octobre 2008

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

07/11/2008

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

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

Fonctionnaire autorisé

Hermann, Patrice

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>CARTRON G ET AL: "Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPANY, ORLANDO, FL, US, vol. 99, no. 3, 1 février 2002 (2002-02-01), pages 754-758, XP002404674 ISSN: 0006-4971 le document en entier</p>	1-24
A	<p>WO 2005/040217 A (UNIV CAMBRIDGE TECH [GB]; ARMOUR KATHRYN LESLEY [GB]; CLARK MICHAEL RO) 6 mai 2005 (2005-05-06) le document en entier</p>	1-24
A	<p>MANCHES OLIVIER ET AL: "In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPANY, ORLANDO, FL, US, vol. 101, no. 3, 1 février 2003 (2003-02-01), pages 949-954, XP002451263 ISSN: 0006-4971 le document en entier</p>	1-24
A	<p>MUNN D H ET AL: "ROLE OF LOW-AFFINITY FC RECEPTORS IN ANTIBODY-DEPENDENT TUMOR CELL PHAGOCYTOSIS BY HUMAN MONOCYTE-DERIVED MACROPHAGES" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 51, 15 février 1991 (1991-02-15), pages 1117-1123, XP000918925 ISSN: 0008-5472 le document en entier</p>	1-24

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2008/000598

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2005040217 A	06-05-2005	AU 2004283135 A1	06-05-2005
		CA 2541868 A1	06-05-2005
		EP 1673392 A2	28-06-2006
		US 2007041966 A1	22-02-2007
		US 2005215768 A1	29-09-2005
