

(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
20 février 2003 (20.02.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/014163 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

C07K 16/42, C12N 15/13, A61K 39/395,
A61P 37/00, 35/00, G01N 33/577, 33/68

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR02/02813

(22) Date de dépôt international : 6 août 2002 (06.08.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :

0110553 7 août 2001 (07.08.2001) FR

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) :

ABTECH [FR/FR]; 151 Boulevard du Montparnasse,
F-75006 Paris (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS** [FR/FR]; 3, rue
Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **PLOUET,
Jean** [FR/FR]; 29, rue Naulet, F-31400 Toulouse (FR).
FONS, Pierre [FR/FR]; Résidence Bel Horizon, 17 rue Ju-
lia, F-31500 Toulouse (FR). **TROMBE, Marc** [FR/FR]; 60
rue des 36 Ponts, F-31400 Toulouse (FR).

(74) Mandataires : **BREESÉ, Pierre** etc.; Breesé-Majerowicz,
3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).

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

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

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

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

(54) Title: ANTI-IDIOTYPIC ANTIBODIES OF HLA CLASS I MOLECULES AND THE USE THEREOF IN THE PREPARA-
TION OF COMPOSITIONS THAT ARE DESIGNED TO INHIBIT VASCULAR ACTIVATION

(54) Titre : ANTICORPS ANTI-IDIOTYPIQUES DE MOLECULES HLA DE CLASSE I ET LEUR UTILISATION POUR LA
PREPARATION DE COMPOSITIONS DESTINEES A INHIBER L'ACTIVATION VASCULAIRE

(57) Abstract: The invention relates to an anti-idiotypic antibody of a HLA class I molecule, a fragment or derivative of same and
a gene that codes for said antibody. The invention also relates to a pharmaceutical composition that can be used to prevent or inhibit
angiogenesis comprising at least one such anti-idiotypic antibody.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet un anticorps anti-idiotypique d'une molécule HLA de classe I, un fragment ou
un dérivé de celui-ci, ainsi qu'un gène codant cet anticorps. L'invention concerne aussi une composition pharmaceutique utile pour
prévenir ou inhiber l'angiogénèse comprenant au moins un tel anticorps anti-idiotypique.



WO 03/014163 A1

ANTICORPS ANTI-IDIOTYPIQUES DE MOLECULES HLA DE CLASSE I ET LEUR UTILISATION POUR LA PREPARATION DE COMPOSITIONS DESTINEES A INHIBER L'ACTIVATION VASCULAIRE.

5 La présente invention se rapporte au domaine de l'inhibition de l'angiogénèse impliquée dans des nombreux syndromes prolifératifs pathologiques. L'invention concerne des anticorps anti-idiotypiques de molécules du Complexe Major d'Histocompatibilité (CMH) et tout particulièrement à
10 des anticorps anti-idiotypiques de molécules solubles HLA de classe I, comme HLA-Gs ou HLA-B7s. L'invention concerne la préparation de ces anticorps et leur utilisation dans des compositions pharmaceutiques utiles pour inhiber l'angiogénèse, et donc destinées au traitement des
15 pathologies angiogéniques impliquant des cellules endothéliales et en particulier pour enrayer leur prolifération tumorale. L'invention vise également l'utilisation de ces anticorps anti-idiotypiques pour vectoriser des substances d'intérêt thérapeutique ou de
20 diagnostic au niveau des cellules endothéliales impliquées dans un processus d'angiogénèse pathologique ou non pathologique.

Les cellules endothéliales tapissent l'intérieur de
25 tous les vaisseaux sanguins de l'organisme. Ces cellules ont un phénotype quiescent, elles ne prolifèrent quasiment pas, seulement 0,01% des cellules endothéliales sont engagées dans la division cellulaire à un moment donné. Le rôle physiologique des cellules endothéliales est très
30 vaste, elles participent à de nombreux phénomènes vitaux pour l'organisme : coagulation sanguine, maintien de la pression artérielle, recrutement de cellules circulantes, synthèse de cytokines, construction de nouveaux vaisseaux irriguant les territoires voisins lors d'une hypoxie.
35 Toutes ces fonctions nécessitent ou s'accompagnent d'un

changement de phénotype des cellules endothéliales qui deviennent alors «activées», c'est à dire que la paroi vasculaire devient capable de fixer des cellules du sang circulant ou de répondre aux actions chimiotactiques des facteurs de croissance. L'activation endothéliale est donc un état transitoire commun aux cellules endothéliales, préalable à toute réponse fonctionnelle.

Chez l'adulte, les parois de ces vaisseaux ne présentent pas de molécules d'adhésion pour immobiliser les lymphocytes du sang circulant. Lors d'une inflammation, les cellules endothéliales expriment à leur surface des molécules d'adhésion les lymphocytes activés -en particulier les cellules NK (natural killer)- c'est à dire qu'elles déroulent des antennes pour immobiliser les lymphocytes tueurs. Lors des greffes par exemple le maintien au froid du greffon suffit à activer les cellules endothéliales du greffon qui alors deviennent capables d'immobiliser les lymphocytes. Ces lymphocytes pourront traverser la couche des cellules endothéliales ou les détruire puis coloniser le greffon et induire la synthèse de cytokines, ce qui amplifie la réaction immunitaire et aboutit à la destruction du greffon.

Lorsqu'un territoire requiert un apport accru en oxygène et en nutriments, il réagit en relarguant des facteurs solubles qui convertissent le phénotype des cellules endothéliales en un phénotype activé, et des facteurs mitogènes pour les cellules endothéliales de phénotype activé. Ces cellules endothéliales acquièrent enfin un phénotype angiogénique et deviennent capables d'effectuer le programme d'angiogénèse, c'est-à-dire le développement de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau préexistant. Ce phénomène est normal et contrôlé lors d'une blessure ou dans la maturation du corps jaune de l'ovaire; en revanche, il devient dangereux dans des

situations pathologiques où l'angiogénèse n'est plus contrôlée, par exemple dans la rétinopathie diabétique, la polyarthrite et le développement tumoral. L'entrée d'une cellule dans un programme d'angiogénèse nécessite son
5 activation préalable (Ortége, 1997 ; Ortége, 1999).

Il a été montré que les cellules endothéliales expriment des molécules HLA de classe I à leur surface dont le rôle n'est pas clairement établi (Majema, 1997 ; Rebman
10 1997 ; Blaschitz 1997). Il a été proposé que la surexpression de ces molécules HLA de classe I par les cellules endothéliales pourrait inhiber la migration transendothéliale des lymphocytes NK et contribuer à atténuer le rejet de greffe. Par ailleurs la dimérisation
15 de molécules HLA-I par l'intermédiaire d'un anticorps reconnaissant toutes les molécules HLA-I stimule l'expression de récepteurs du FGF2 à la surface des cellules endothéliales et leur prolifération (Harris, 1997).

20 Les molécules HLA de classe I ont été décrites comme pouvant s'associer structurellement à certains récepteurs membranaires, y compris des récepteurs à l'insuline et récepteurs à EGF. Il a aussi été démontré que des peptides dérivés de molécules HLA de classe I pouvaient
25 réguler la fonction des récepteurs à l'insuline. Cependant, à ce jour aucune description d'un quelconque rôle non immunologique de la forme soluble de HLA G1 n'a été rapporté et il n'existe non plus de données expérimentales démontrant la présence de récepteurs au HLA-I sur les
30 cellules endothéliales. Aucun effet biologique des HLA-I sur ces cellules ou dans l'angiogénèse n'a été décrit.

Les Inventeurs ont développé une expertise dans le domaine de l'activation endothéliale, et ont cherché à vérifier si la dimérisation de molécules HLA-I par
35 l'anticorps W6/32 (Barnstable CJ, 1978 ; Brodsky FM, 1982)

stimulait l'expression des récepteurs du VEGF. Sachant que certaines molécules HLA-I possèdent un polymorphisme important et qu'elles se lient à des récepteurs distincts encore mal connus, un mime polyvalent des HLA-I a été
5 préparé grâce à la stratégie de fabrication d'anticorps anti-idiotypiques.

En conséquence, l'invention a pour objet un anticorps anti-idiotypique d'une molécule HLA de classe 1.

L'invention envisage tant des anticorps anti-
10 idiotypiques polyclonaux ou monoclonaux qui peuvent être préparés par des techniques décrites dans la littérature (Kohler G, 1976) à partir de molécule HLA de classe 1 comme rapportées dans la partie expérimentale ci-après. Il peut aussi s'agir de fragments de tels anticorps anti-
15 idiotypique comme des fragments Fab'2 ou Fab ou d'une combinaison de tels fragments.

Il s'agit de préférence d'anticorps anti-idiotypique de toute molécule HLA de classe I soluble ou non. Avantageusement, la molécule HLA de classe 1 est
20 choisie parmi : HLA-A, B, C, D, F, ou G.

Ainsi, l'invention concerne des anticorps anti-idiotypiques de molécules dérivés des molécules HLA de classe 1, solubles ou non, présentant des propriétés anti-
25 angiogéniques que l'homme du métier est à même de tester. Il peut s'agir de fragments, de forme tronquée, de séquences modifiées par délétion, addition ou suppression d'un ou plusieurs acides aminés.

30 L'invention concerne aussi une molécule d'acide nucléique comprenant ou constituée par une séquence polynucléotidique codant pour un anticorps anti-idiotypique de toute molécule HLA de classe I, soluble ou non, un fragment ou dérivé de celui-ci.

Une telle molécule d'acide nucléique est utile pour la préparation des anticorps anti-idiotypiques selon l'invention par des techniques de génie génétique.

L'invention envisage à titre de molécule d'acide
5 nucléique comprenant une séquence polynucléotidique codant un anticorps anti-idiotypique d'une molécules soluble HLA de classe 1, une molécule d'acide nucléique comprenant ladite séquence placée sous le contrôle de séquences de régulation de son expression. Une telle molécule d'acide
10 nucléique est un vecteur, comme par exemple un plasmide, un virus recombinant, une cellule transfectée par un vecteur d'expression plasmidique ou viral.

Les anticorps anti-idiotypiques selon l'invention
15 sont remarquables en ce qu'ils sont capables de se fixer sur les cellules endothéliales et d'inhiber l'activation endothéliale menant à l'angiogénèse.

L'invention a donc aussi pour objet une composition pharmaceutique utile pour prévenir ou inhiber l'angiogénèse
20 comprenant au moins un anticorps anti-idiotypique ou une molécule d'acide nucléique codant un tel anticorps comme défini précédemment.

Une telle molécule d'acide nucléique est utile dans des protocoles de thérapie génique ou de thérapie
25 cellulaire consistant à administrer la dite molécule d'acide nucléique ou des cellules transformées par la dite molécule d'acide nucléique a un individu de façon à exprimer l'anticorps anti-idiotypique et ainsi inhiber l'angiogénèse.

30

Ainsi, ces anticorps anti-idiotypiques et les molécules d'acide nucléique correspondantes sont particulièrement adaptées pour la préparation de médicaments destinés à prévenir ou à traiter l'angiogénèse
35 et donc la prolifération des cellules endothéliales. Parmi

les pathologies dont le traitement nécessite l'inhibition de l'activation endothéliale, on peut citer le rejet d'allogreffes et de xénogreffes, les acrocyanoses, les sclérodermies, les cancers, les rétinopathies diabétiques, la polyarthrite rhumatoïde, les angiomes, les angiocarcinomes, en particulier la maladie de Castelman et le sarcome de Kaposi. Les compositions pharmaceutiques selon l'invention sont aussi utiles pour la préparation de greffons entre le prélèvement et la transplantation. On sait en effet, que le froid suffit à induire la translocation d'intégrines permettant l'adhésion de lymphocytes activés sur les cellules endothéliales, et donc à activer les cellules endothéliales. La désactivation endothéliale réalisée par la mise en œuvre des anticorps anti-idiotypiques et des compositions les contenant selon l'invention permettrait donc de s'opposer à la réaction de rejet. L'invention concerne donc un procédé de préparation de greffons entre le prélèvement et la transplantation consistant à mettre en contact le dit greffon avec des anticorps anti-idiotypiques selon l'invention. La concentration en anticorps anti-idiotypiques pour cette application serait par exemple de l'ordre de 100 microgrammes à 100 mg par kilo de poids corporel.

La mise en évidence dans le cadre de l'invention de la fixation des molécules HLA de classe 1 sur un récepteur à la surface des cellules endothéliales permettent également d'utiliser les anticorps anti-idiotypiques de ces molécules pour identifier plus précisément ces récepteurs et identifier des ligands. De tels ligands sont utiles soit pour stimuler soit pour inhiber l'activation endothéliale et ainsi disposer de nouveaux agents actifs pour traiter les pathologies. Parmi les pathologies nécessitant de stimuler l'activation endothéliale et donc l'angiogénèse on peut citer la cicatrisation, la maturation du corps jaune

de l'ovaire, la perfusion des territoires ischémiés lors de thromboses vasculaires comme dans l'artérite des membres inférieurs et l'infarctus du myocarde. A titre de substance de référence capable de stimuler l'angiogénèse on peut
5 citer des anticorps monoclonaux ou polyclonaux dirigés contre les molécules HLA de classe 1, comme l'anticorps W6/32.

Une méthode d'identification des récepteurs des molécules HLA de classe 1 à la surface des cellules
10 endothéliales selon l'invention comprend les étapes suivantes :

- Purification de l'anticorps monoclonal selon les techniques connues de l'homme du métier.
- Préparation d'une matrice de chromatographie d'affinité dans laquelle l'anticorps monoclonal purifié est
15 conjugué à la phase solide.
- Chromatographie d'un lysat cellulaire (exemple cellules endothéliales cultivées) ou tissulaire (par exemple placenta humain).
- 20 - Elution du récepteur par un agent chaotropique (NaCl, urée, chlorure de guanidine, choc acide ou basique) ou ligand spécifique (exemple fragment Fab du susdit anticorps).
- Séquençage de la protéine par les techniques
25 classiques.

Une méthode d'identification de ligands des récepteurs des molécules HLA de classe 1 à la surface des cellules endothéliales selon l'invention comprend des étapes similaires, excepté que la matrice de la
30 chromatographie d'affinité présentera le récepteur purifié précédemment ou un fragment. Alternativement le récepteur pourra être remplacé par un récepteur recombinant obtenu par les techniques de génie génétique.

L'invention s'intéresse encore au dosage des
35 molécules HLA de classe I ou d'anticorps anti-idiotypiques,

comme marqueurs de pathologies angiogéniques. Par exemple l'anticorps W6/32 ou tout autre anticorps anti molécule HLA de classe I est immobilisé sur un support. Il est mis en contact une quantité fixe de l'anticorps anti-idiotypique
5 marqué par de la biotine ou un élément radioactif tel que l'iode 125 et un volume connu du liquide biologique contenant la molécule à tester qui rentre donc en compétition avec la liaison de l'anticorps anti-idiotypique marqué sur l'anticorps anti HLA de classe I. Ainsi donc la
10 diminution de la liaison de l'anticorps marqué anti-idiotypique est proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-idiotypique ou de molécules HLA de classe I dans le milieu biologique. Ainsi, l'invention a pour objet une méthode de dosage de molécules HLA de classe I ou
15 d'anticorps anti-idiotypiques de ces molécules éventuellement présentes dans un échantillon biologique comprenant :

- la mise en contact desdites molécules ou anticorps de l'échantillon avec une quantité déterminée
20 d'anticorps anti-idiotypiques de l'invention, avantageusement marqués et fixés à des anticorps anti-molécule HLA de classe I,

- la mesure de la diminution de la liaison des anticorps anti-idiotypiques marqués avec les anticorps
25 anti-molécule HLA de classe I.

Avantageusement, cette méthode est réalisée en immobilisant les anticorps anti-molécule HLA de classe I sur un support.

30 Les anticorps anti-idiotypiques selon l'invention sont remarquables en ce qu'ils peuvent se fixer à la surface des cellules endothéliales grâce aux récepteurs des molécules HLA de classe I. Ainsi, les dits anticorps anti-idiotypiques sont utiles pour vectoriser des substances
35 d'intérêt au niveau de foyers d'activation endothéliale

pathologique ou non, comme de sites angiogéniques. L'invention a donc pour objet l'utilisation d'un anticorps anti-idiotypique d'une molécule HLA de classe 1 seul ou associé à une substance d'intérêt pour la préparation d'une composition destinée à inhiber l'angiogénèse ou à détecter des sites angiogéniques.

La substance d'intérêt peut être une substance chimique ou biologique active comme un médicament. On peut citer à titre d'exemple de tels médicaments : une toxine animale ou végétale, un composé radioactif, une drogue cytostatique ou cytolytique, un gène suicide ou une anti-sens.

La substance d'intérêt peut être aussi une substance de diagnostic comme un traceur radioactif ou un produit de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique permettant de marquer les sites angiogéniques.

Les foyers d'activation endothéliale peuvent ainsi être visualisés dans tout système d'imagerie médicale.

L'invention concerne donc un composé constitué d'un anticorps anti-idiotypique d'une molécule HLA de classe 1, ou d'un dérivé de celui-ci, couplé à une substance d'intérêt comme défini ci-dessus, ledit composé étant capable de se fixer aux cellules endothéliales par l'intermédiaire d'un récepteur. Les anticorps de l'invention constituent donc un système de vectorisation de substances d'intérêt au niveau des cellules endothéliales impliquées dans des phénomènes angiogéniques particulièrement utiles pour traiter ou détecter les pathologies indiquées précédemment.

Le couplage de l'anticorps anti-idiotypique avec la substance d'intérêt peut être réalisé par tout moyen de liaison clivable ou non clivable dans un milieu biologique comme par exemple :

- Couplage par liaison covalente

- Réaction d'oxydation aboutissant à la substitution d'un atome d'hydrogène par un atome d'iode sur un noyau indole

Ces composés de l'invention peuvent être aussi des
5 protéines ou de gènes de fusion.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront dans les exemples qui suivent où il sera fait référence aux dessins en annexe dans
10 lesquels :

- La figure 1 représente le titre des souris sur cellules Fv et montre que IgId/HLA-I reconnaît des récepteurs sur les cellules endothéliales.

- La figure 2 montre que l'effet chimiotactique du
15 W6/32 n'est pas inhibé par les VEGFR1s ou VEGFR2s alors que l'effet chimiotactique du VEGF est aboli.

- La figure 3 montre l'inhibition de l'action chimiotactique du VEGF par IgId/HLA-I.

- La figure 4 montre qu'IgId/HLA-I n'a pas d'effet
20 sur la prolifération basale des cellules HUVEC.

- La figure 5 montre l'action des anticorps monoclonaux anti-idiotypique de HLA de classe 1 sur la prolifération des cellules endothéliales.

25 A - METHODES D'ETUDE.

I - Réactifs.

I.1 - Protéines utilisées.

Le VEGF (isoforme de 165 acides aminés) est produit par infection de cellules d'insecte SF9 par un baculovirus
30 recombinant contenant le cDNA correspondant et le FGF2 est produit chez Escherichia Coli (Plouët et al., 1997).

L'anticorps W6/32 est produit par injection de l'hybridome dans le péritoine de souris Balb/c. Les ascites sont recueillies 10-15 jours après l'inoculation et les IgG
35 purifiées par précipitation au sulfate d'ammonium suivie de

chromatographie sur protéine A sepharose. Les fragments Fab sont préparés par clivage à la papaïne.

Les récepteurs solubles du VEGF sont produits dans le milieu conditionné de cellules CHO transfectées par la construction correspondante. Les domaines extracellulaires des récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 (boucles de type immunoglobuline 1-7) sont synthétisés par PCR, puis séquencés pour vérifier qu'il n'y a pas eu de mutation. Les inserts sont ensuite insérés dans le vecteur pcDNA-3/myc/His (Invitrogen). Les plasmides sont transfectés dans des cellules CHO pgsA-745 et les clones sécréteurs sélectionnés par leur résistance à la généticine. Le milieu conditionné (1 litre) est ensuite précipité par 50% (poids/poids) de sulfate d'ammonium, dialysé contre du tampon Tris 0,01 M, NaCl 0,05 M puis chromatographié sur une colonne de Sp Sepharose. Les fractions actives sont collectées par un gradient discontinu de NaCl (0,2-0,5 M) puis chromatographiées sur une colonne de nickel-sepharose. La pureté des protéines VEGFR1 et VEGFR2 purifiées est ensuite attestée par gel de polyacrylamide-SDS (>90%) et conservés à -80°C jusqu'à l'utilisation.

I.2 - Cellules utilisées.

Les milieux de culture et les sérums proviennent de la compagnie Life Technologies™.

Les cellules endothéliales de veines de cordon ombilical humain (HUVEC) sont cultivées sur plastique recouvert de gélatine diluée à 0,2% dans du PBS. Les cellules sont cultivées en milieu endothélial SFM supplémenté par 50 unités/ml de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine, et 20% de sérum de veau fœtal et maintenues dans une étuve à 10% CO₂. Ces cultures sont entretenues avec du VEGF à 2 ng/ml ajouté au milieu tous les deux jours.

Les cellules endothéliales d'aorte bovine fœtale (FBAE) sont cultivées sur plastique recouvert de gélatine

diluée à 0,2% dans du PBS. Les cellules sont cultivées en milieu DMEM-glutamax supplémenté par 50 unités/ml de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine, et 10% de sérum de veau nouveau-né et maintenues dans une étuve à 10 % CO₂.

- 5 Ces cultures sont entretenues avec du VEGF à 2 ng/ml ajouté au milieu tous les deux jours et exhibent un phénotype angiogénique.

II - Préparation d'anticorps anti-idiotypiques.

II.1 - Fabrication d'anticorps préimmuns (Ig PI).

- 10 Avant chaque immunisation, du sang est prélevé, le sérum est fractionné immédiatement après le recueil et 1,5 ml de sérum est chromatographié sur une colonne de protéine A. La colonne est lavée par du PBS et les immunoglobulines sont éluées par de la glycine 0,2 M, pH 2,5, immédiatement
15 neutralisées par adjonction de 1/5 du volume de K₂HPO₄ 1 M, puis dialysées contre du PBS. Les immunoglobulines (Ig PI) s o n t c o n s e r v é e s à -80 °C jusqu'à leur utilisation.

- ### II.2 - Anticorps anti-idiotypiques de HLA-I (Ig2Id 20 HLA-1).

- Les souris reçoivent par voie sous-cutanée 10 µg de W6/32 mélangé volume à volume avec de l'adjuvant complet de Freund sous un volume final de 100 µl. Quatre rappels sont effectués toutes les deux semaines par injection par voie
25 intapéritonéale du mélange, excepté que l'adjuvant complet est remplacé par de l'adjuvant incomplet.

- La veille de la fusion, soit à J 67, cinq souris Balbc non-immunisées sont sacrifiées pour l'obtention des macrophages servant de cellules nourricières aux
30 hybridomes. Les macrophages sont récupérés par injection de 8ml de milieu de culture ISCOVE dans le péritoine des souris. Après centrifugation, les macrophages sont repris dans du milieu ISCOVE contenant 20% de sérum de veau foetal (Biochrom, lot 5612). Ces cellules sont ensuite distribuées

dans 20 plaques de 96 puits à raison de 100µl par puits (environ 3×10^4 cellules/puits).

Le lendemain, soit à J 68, les souris présentant les titres les plus élevés d'anticorps anti-Id sont sacrifiées. Leurs rates sont prélevées et dilacérées dans du milieu ISCOVE pour libérer les splénocytes. Le tissu conjonctif est dégagé et les splénocytes sont centrifugés et comptés. En parallèle, la lignée de myélome de souris Ag8X63 a été cultivée depuis 10 jours dans du milieu ISCOVE à 20% de sérum Myoclone. Ces cellules sont lavées et numérées.

Les deux types cellulaires, splénocytes et myélomes, sont mélangés de façon à obtenir un rapport de 1 cellule de myélome Ag8X63 pour 6 splénocytes. La fusion s'effectue par ajout de 20 fois 50 µl de polyéthylène glycol (PEG) à 30 secondes d'intervalle. 4 ml de milieu ISCOVE préchauffé à 37°C sont alors ajoutés goutte à goutte sur la suspension cellulaire, puis après une période d'incubation de 4 minutes à 37°C, 4 ml sont ajoutés. La suspension est centrifugée puis le culot cellulaire est alors repris dans 100 ml de milieu ISCOVE complémenté avec 20% de sérum de veau fœtal et du HAT 1X (50X: Hypoxanthine 5mM, Aminoptérine 20µM et Thymidine 0.8mM) et distribué à raison de 100µl par puits sur les macrophages.

Après 5 jours, 100 µl de milieu HAT est ajouté, et entre 8 et 14 jours le milieu conditionné de chaque hybridome est prélevé pour mesurer la quantité d'anticorps dirigés contre les fragments Fab de l'anticorps W6/32 (Elisa anti-idiotype) et les cellules endothéliales.

Les hybridomes sélectionnés pour leur capacité à sécréter des anticorps anti-Id sont alors clonés, c'est-à-dire que les cellules sont ensemencées en condition de dilution limite (5 cellules/ml) sous un volume de 0,1 ml par puits. Le milieu est changé après 10 jours. Après 15 jours, certains puits contiennent des foyers de cellules

qui se sont multipliées à partir de la cellule ensemencée au départ, donc toutes ces cellules sont identiques et sont issues du même clone. Quand la surface occupée par les cellules représente au moins la moitié de la surface totale
5 du puits, le milieu est prélevé et analysé comme précédemment. A ce stade, on peut sélectionner les clones producteurs d'anticorps anti-Id et connaître leur spécificité.

Une fois les clones identifiés leur nature
10 monoclonale a été confirmée par l'opération classique consistant à ensemencer une plaque de 96 puits avec des cellules issues du même clone diluées en conditions limites comme précédemment. Les clones sécréteurs doivent donc tous sécréter un anticorps de même spécificité pour que l'on
15 déclare cet anticorps monoclonal.

Un troisième clonage est alors effectué pour s'assurer que les clones sont bien monoclonaux.

Le criblage des anticorps anti-Id est effectué par les 2 Elisa, comme décrit ci-après.

20 III - Étude de la spécificité des anticorps.

III.1 - ELISA.

a) anti-idiotypique.

Les boîtes de plastique sont tapissées de fragments Fab de l'anticorps W6/32. Les puits sont incubés avec les
25 immunoglobulines à tester (2 h, 37°C). Après rinçages, les immunoglobulines fixées sont révélées à l'aide d'anticorps de chèvre conjugués à la peroxydase dirigés contre les fragments Fc immunoglobulines de souris.

Ainsi, si un anticorps se fixe sur les fragments
30 Fab de W6/32, il est soit dirigé contre l'isotype soit contre l'idiotope. L'utilisation ultérieure d'un second ELISA dans lequel les boîtes sont tapissées de fragments Fab d'un anticorps de même isotype permettra d'éliminer les faux positifs et de ne conserver que les anticorps anti-
35 idiotypiques, subséquentement dénommé IgId/HLA-I.

La nature anti-idiotypique des surnageants d'hybridomes a été évaluée par ELISA sur plaques tapissées de fragments Fab de W6/32.

635 hybridomes ont été testés.

5 27 anticorps monoclonaux ont été obtenus.

b) Cellules endothéliales.

Les cellules Fv sont incubées à 5000 cellules par puits de multiplaque 96. Après la confluence, les cellules sont rincées et fixées par un traitement n'induisant pas la
10 perméabilisation (0,25% de glutaraldéhyde), saturées par une solution de glycine 1M pH8 puis par une solution d'IgG de lapin. Les cellules sont ensuite abondamment rincées puis les anticorps incubés 2 h à température ambiante. Après rinçages, les immunoglobulines fixées sont révélées à
15 l'aide d'anticorps de chèvre conjugués à la peroxydase dirigés contre les immunoglobulines de souris.

Ainsi, si un anticorps se fixe sur les cellules endothéliales non perméabilisées alors que les immunoglobulines préimmunes ne le font pas, c'est qu'il
20 reconnaît un récepteur spécifique sur ces cellules.

Les 27 anticorps monoclonaux ont ensuite été soumis à un test ELISA sur cellules F/V.

22 anticorps IgId/HLA-I reconnaissent des récepteurs sur les cellules endothéliales.

25 III.2 - Migration cellulaire.

Les cellules FV sontensemencées à forte densité dans des plaques de 12 puits en milieu DMEM supplémenté de 10% de sérum de veau nouveau-né et de 1 ng/ml de VEGF (50
000 cellules par puits). Une fois la confluence atteinte
30 les cellules sont transférées en milieu sans sérum et sans VEGF. Le lendemain les cellules sont décollées par grattage à l'aide d'une pointe mousse et rincées 3 fois. Les modulateurs sont ajoutés au milieu et 24 h après, les cellules sont fixées et colorées au May Grunwald Giemsa

puis les cellules qui ont migré sont comptées dans au moins 8 champs.

III.3 - Prolifération cellulaire.

Les cellules HUVEC sontensemencées à faible
5 densité (2000 cellules/cm²) dans des boîtes de 12 puits
dont la surface a été préalablement tapissée de gélatine.
Les modulateurs sont ajoutés après l'adhésion des cellules.
au plastique de culture, puis après 2 jours. Chaque
condition est étudiée dans trois puits différents. Les
10 cellules sont trypsinisées et comptées au cinquième jour.
Le pourcentage d'inhibition est calculé comme le rapport :

(nombre de cellules de l'échantillon - nombre de
cellules en absence de VEGF) / (nombre de cellules en
présence de VEGF - nombre de cellules en absence de VEGF)

15

B - RÉSULTATS.

I - ELISA.

La nature anti-idiotypique des immunoglobulines
purifiées a été évaluée par ELISA sur plaques tapissées de
20 fragments Fab de W6/32. Les immunoglobulines pré-immunes ne
se fixent pas sur les Fab et IgId/HLA-I le fait.

Les immunoglobulines ont ensuite été évaluées par
leur capacité à reconnaître des cellules endothéliales
activées. Comme l'indique la figure 1, les immunoglobulines
25 pré-immunes ne se fixent pas sur les cellules endothéliales
et IgId/HLA-I le fait. La figure 1 montre donc que
IgId/HLA-I reconnaît des récepteurs sur les cellules
endothéliales.

II - Migration.

30 Il a été démontré que la dimérisation de molécules
HLA de classe I transmembranaires induite par la ligation à
l'aide de l'anticorps W6/32 stimulait la prolifération des
cellules HUVEC. Cet effet serait dû à la surexpression de
récepteurs du FGF2 (Harris, 1997).

Pour déterminer si cette ligation mettait en jeu aussi le système VEGF, les cellules ont été incubées avec 10 µg/ml de W6/32 et 1 µg/ml de VEGFR1s ou VEGFR2s.

Les cellules FV sont ensemencées à forte densité
5 (50 000 cellules/puits) dans des boîtes de 12 puits en présence de 2 ng/ml de VEGF. 2 jours après la confluence, la prolifération cellulaire est arrêtée par le transfert en milieu ne contenant ni sérum ni VEGF pendant 24 heures. Une blessure est alors pratiquée dans la monocouche par grattage
10 à l'aide d'une pointe mousse, les cellules rincées abondamment puis 10 µg/ml de W6/32 ou 50 ng/ml de VEGF sont ajoutés en présence ou absence de 1 µg/ml de VEGFR1s ou VEGFR2s. Chaque condition est étudiée dans deux puits différents. 24 heures après les cellules sont rincées avec
15 du milieu DMEM, colorées au May Grunwald-Giemsa et les cellules ayant migré sont comptées dans 8 champs par condition.

La figure 2 montre que l'effet chimiotactique du W6/32 n'est pas inhibé par les VEGFR1s ou VEGFR2s alors que
20 l'effet chimiotactique du VEGF est aboli. En conséquence, la signalisation du W6/32 n'est pas liée à celle du VEGF.

La figure 3 montre l'inhibition de l'action chimiotactique du VEGF par IgId/HLA-I.

Les cellules FV sont ensemencées à forte densité
25 (50 000 cellules/puits) dans des boîtes de 12 puits en présence de 2 ng/ml de VEGF. 2 jours après la confluence la prolifération cellulaire est arrêtée par le transfert en milieu ne contenant ni sérum ni VEGF pendant 24 heures. Une blessure est alors pratiquée dans la monocouche par grattage
30 à l'aide d'une pointe mousse, les cellules rincées abondamment puis 50 ng/ml de VEGF sont ajoutés en présence ou absence de 5-50 µg/ml de IgId/HLA-I. Chaque condition est étudiée dans deux puits différents. 24 heures après les cellules sont rincées avec du milieu DMEM, colorées au May

Grunwald-Giemsa et les cellules ayant migré sont comptées dans 8 champs par condition.

IgId/HLA-I n'a pas d'effet sur la migration spontanée des cellules FV. En revanche un excès molaire de 5 100 fois suffit à inhiber pratiquement totalement l'activité chimiotactique du VEGF. En conséquence, la liaison de IgId/HLA-I à ses récepteurs endothéliaux induit un effet inhibant l'activité du VEGF.

III - Mitogénicité.

10 IgId/HLA-I n'a pas d'effet sur la prolifération basale des cellules HUVEC (Figure 4). En revanche 2 classes d'anticorps IgId/HLA-I peuvent être distinguées :

- Les anticorps inhibiteurs (sur un mode dépendant de la dose) de la prolifération des cellules HUVEC induite 15 par le VEGF. En conséquence, la liaison de IgId/HLA-I à ses récepteurs endothéliaux induit un effet inhibant l'activité du VEGF.

- les anticorps stimulateurs (sur un mode dépendant de la dose) de la prolifération des cellules HUVEC induite 20 par le VEGF. En conséquence, la liaison de IgId/HLA-I à ses récepteurs endothéliaux induit un effet stimulant de l'activité du VEGF.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bian H, Reed EF. Anti-HLA class I antibodies transduce signals in endothelial cells resulting in FGF
5 receptor translocation, down-regulation of ICAM-1 and cell proliferation. *Transplant Proc* 2001 ;33(1-2):311
- Bian H, Harris PE, Reed EF. Ligation of HLA class I molecules on smooth muscle cells with anti-HLA antibodies induces tyrosine phosphorylation, fibroblast growth factor
10 receptor expression and cell proliferation. *Int Immunol* 1998;10(9):1315-23
- Barnstable CJ., Bodmer WF., Brown G., Galfre G., Milstein C., Williams AF., Ziegler A. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and
15 other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis.
- Blaschitz A., Lenfant F., Mallet V., Hartmann M., Bensussan A., Geraghty D. E., Le Bouteiller P. and Dohr G. (1997) Endothelial cells in chorionic fetal vessels of
20 first trimester placenta express HLA-G. *Eur J Immunol* 27, 3380-8.
- Brodsky FM, Parham P. Monomorphic anti-HLA-A,B,C monoclonal antibodies detecting molecular subunits and combinatorial determinants. *J Immunol* 1982 128(1):129-35
- 25 - Kohler G, Howe SC, Milstein C. Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines. *Eur J Immunol* 1976 Apr;6(4):292-5
- Lanier L. L. (1998) NK cell receptors. *Annu Rev*
30 *Immunol* 16, 359-93.
- Maejima M., Fujii T., Kozuma S., Okai T., Shibata Y. and Taketani Y. (1997) Presence of HLA-G-expressing cells modulates the ability of peripheral blood mononuclear cells to release cytokines. *Am J Reprod Immunol* 38, 79-82.

- Ortéga N., Jonca F., Vincent S., Favard C., Ruchoux M-M, Plouët J., 1997. Systemic activation of the vascular endothelial growth factor receptor flk-1 selectively triggers angiogenic endothelial cells. *Am. J. Pathol.*, 151, 1215-1224.

- Ortéga N., Hutchings H., Plouët J., 1999. Signal relays in the VEGF system. *Front. Biosci.*, 4, D141-D152.

- Plouët J., Moro F., Coldeboeuf N., Bertagnolli S., Clamens S., Bayard F., 1997. Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189 aa form by urokinase is required for its mitogenic activity. *J. Biol. Chem.*, 272, 13390-13396.

- Prats, H., Kaghah, M., Prats, A.C., Klagsbrun, M., Lelias, J.M., Liauzun, P., Chalon, P., Tauber, J.P., Amalric, F., Smith, J.A. (1989). High molecular mass forms of fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 1836-1840.

- Rebmann V., Pfeiffer K., Passle Taylor R. N. (1997) Review: immunobiology of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 37, 79-86.

REVENDECATIONS

1) Un anticorps anti-idiotypique d'une molécule HLA de classe 1, un fragment ou un dérivé de celui-ci.

5

2) Un anticorps anti-idiotypique selon la revendication 1, choisi parmi un anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un fragment comme Fab'2 ou Fab ou une combinaison de ceux-ci.

10

3) Un anticorps anti-idiotypique selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la molécule HLA de classe 1 est choisie parmi : HLA-A, B, C, D, F, ou G.

15

4) Une molécule d'acide nucléique comprenant ou constituée par une séquence polynucléotidique codant pour un anticorps anti-idiotypique d'une molécule HLA de classe 1 selon l'une des revendications 1 à 3.

20

5) Une composition pharmaceutique utile pour prévenir ou inhiber l'angiogénèse comprenant au moins un anticorps anti-idiotypique selon l'une des revendications 1 à 3 ou une molécule d'acide nucléique selon la revendication 4.

25

6) Utilisation d'anticorps anti-idiotypique selon l'une des revendications 1 à 3 ou d'une molécule d'acide nucléique selon la revendication 4 pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou à traiter une pathologie impliquant une activation endothéliale.

30

7) Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que la pathologie impliquant une activation endothéliale est choisie dans le groupe

35

comprenant : le rejet d'allogreffes et de xénogreffes, les acrocyanoses, les sclérodermies, les cancers, les rétinopathies diabétiques, la polyarthrite rhumatoïde, les angiomes, les angiocarcinomes, en particulier la maladie de
5 Castelman et le sarcome de Kaposi.

8) Utilisation d'anticorps anti-idiotypique selon l'une des revendications 1 à 3 ou d'une molécule d'acide nucléique selon la revendication 4 pour la préparation
10 d'une composition pharmaceutique utile pour la conservation de greffons entre le prélèvement et la transplantation.

9) Utilisation d'anticorps anti-idiotypique selon l'une des revendications 1 à 3 associé à une substance
15 d'intérêt pour la préparation d'une composition destinée à inhiber l'angiogénèse ou à détecter des sites angiogéniques.

10) Un composé constitué d'un anticorps anti-idiotypique d'une molécule HLA de classe 1 selon l'une des revendications 1 à 3 couplé à une substance d'intérêt en
20 thérapie ou diagnostic.

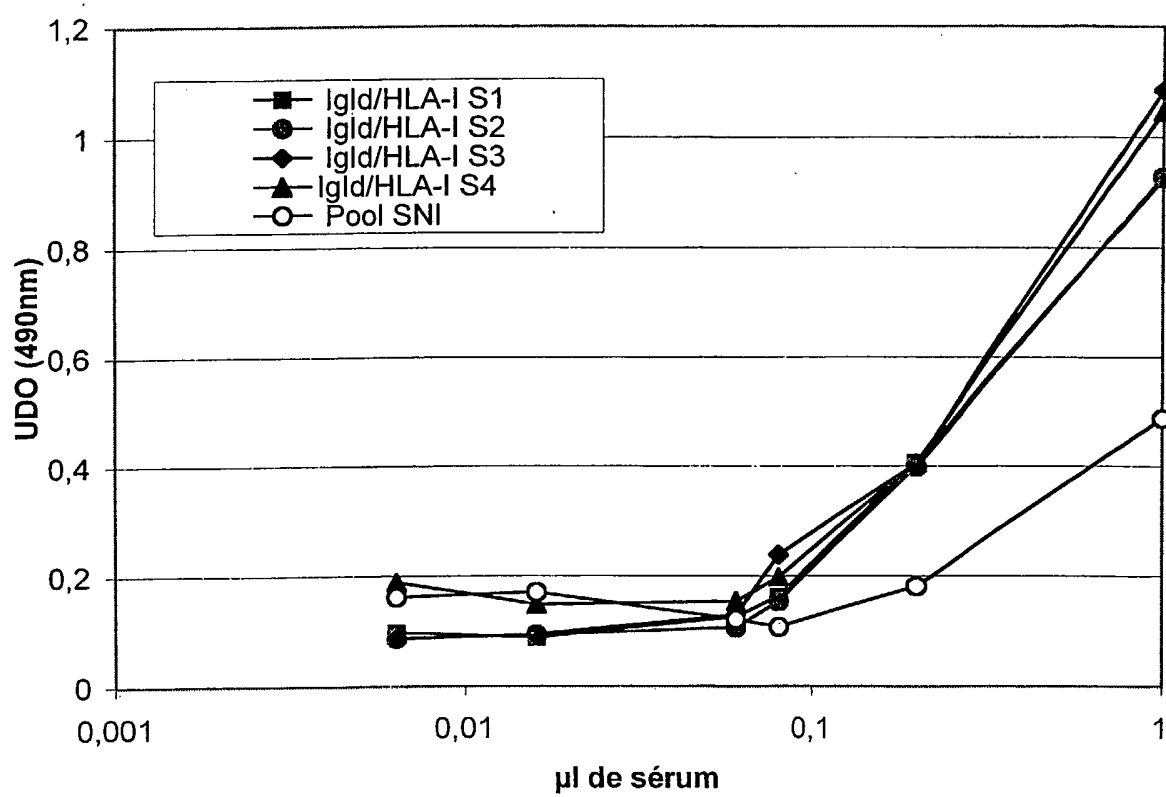
11) Méthode de dosage de molécules HLA de classe I
25 ou d'anticorps anti-idiotypiques de ces molécules éventuellement présentes dans un échantillon biologique caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la mise en contact desdites molécules ou anticorps de l'échantillon avec une quantité déterminée
30 d'anticorps anti-idiotypiques selon l'une des revendications 1 à 3 marqués et fixés à des anticorps anti-molécule HLA de classe I,

- la mesure de la diminution de la liaison des anticorps anti-idiotypiques marqués avec les anticorps
35 anti-molécule HLA de classe I.

1/5

Fig.1



2/5

Fig.2

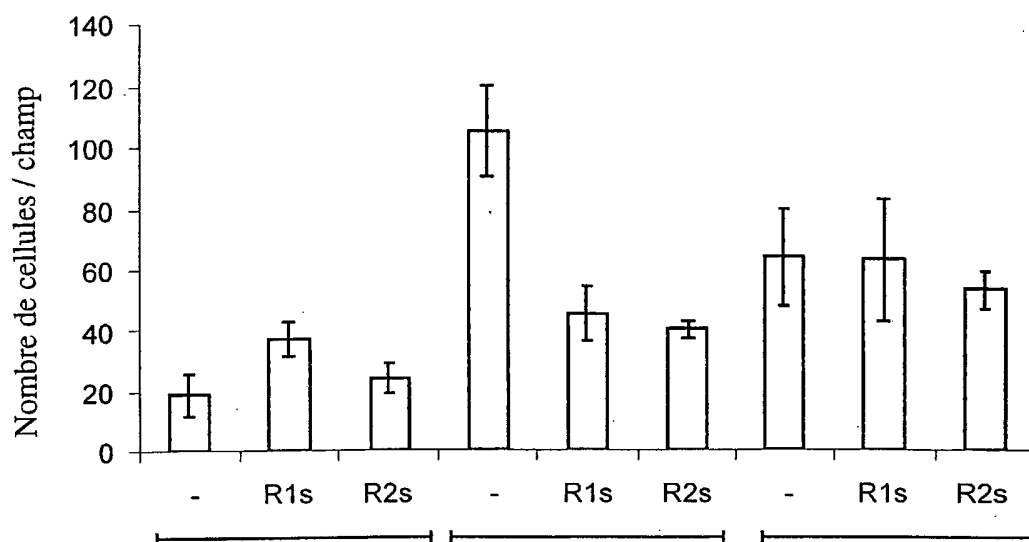
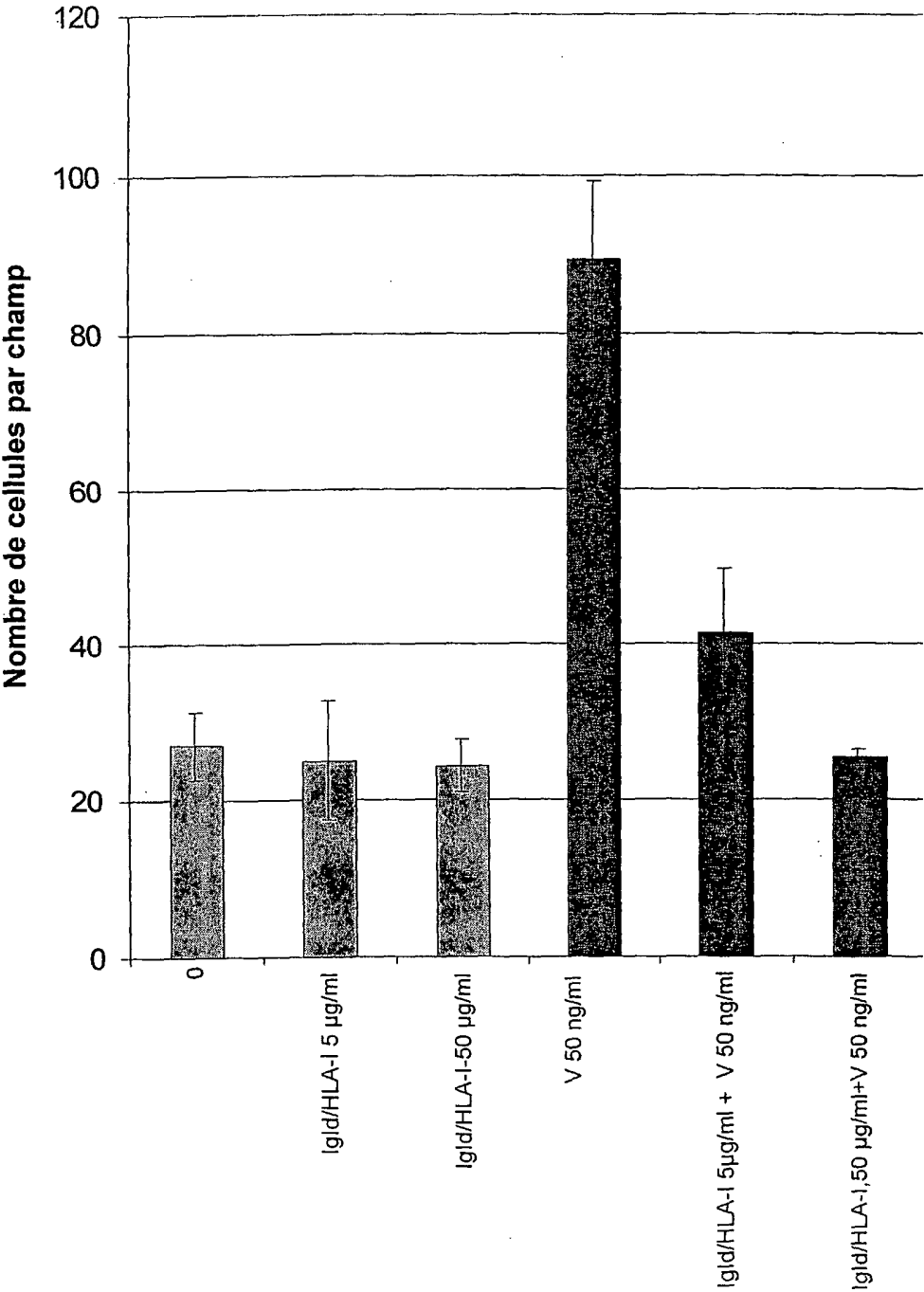


Fig.3



4/5

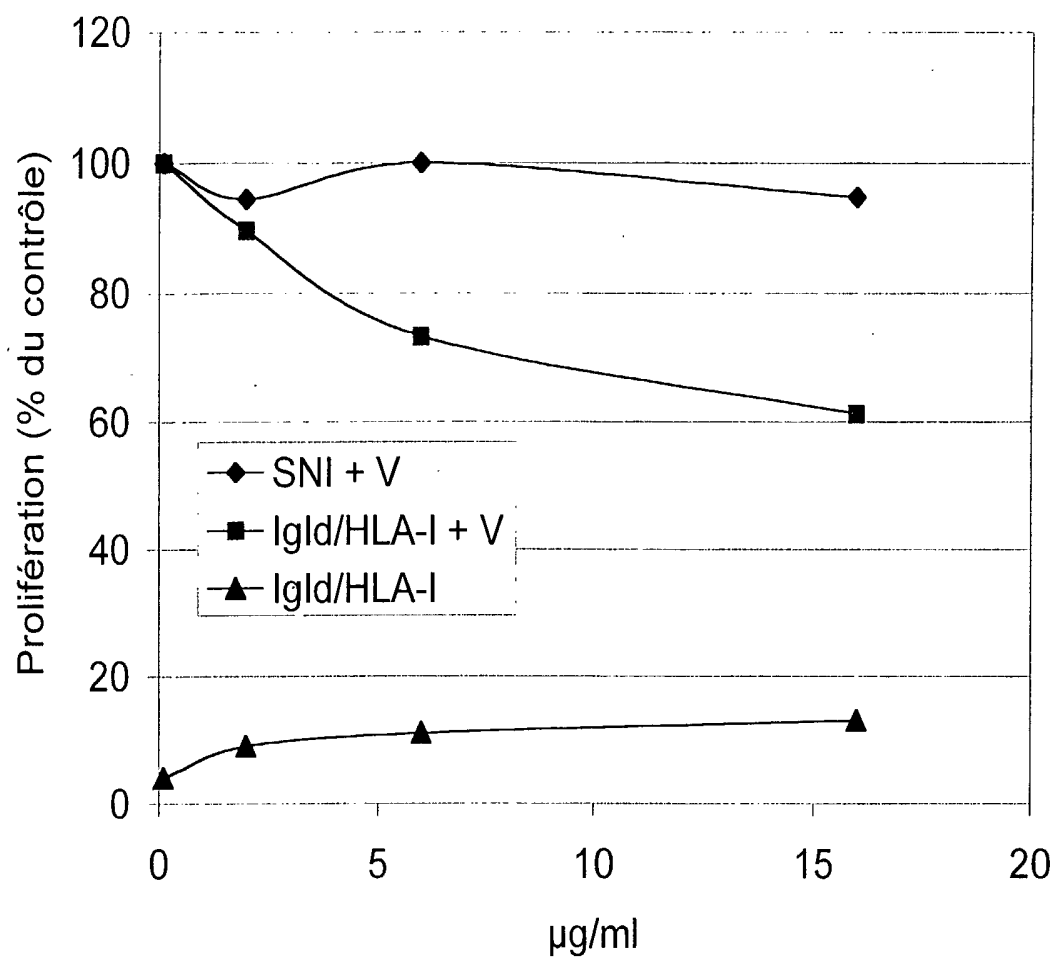
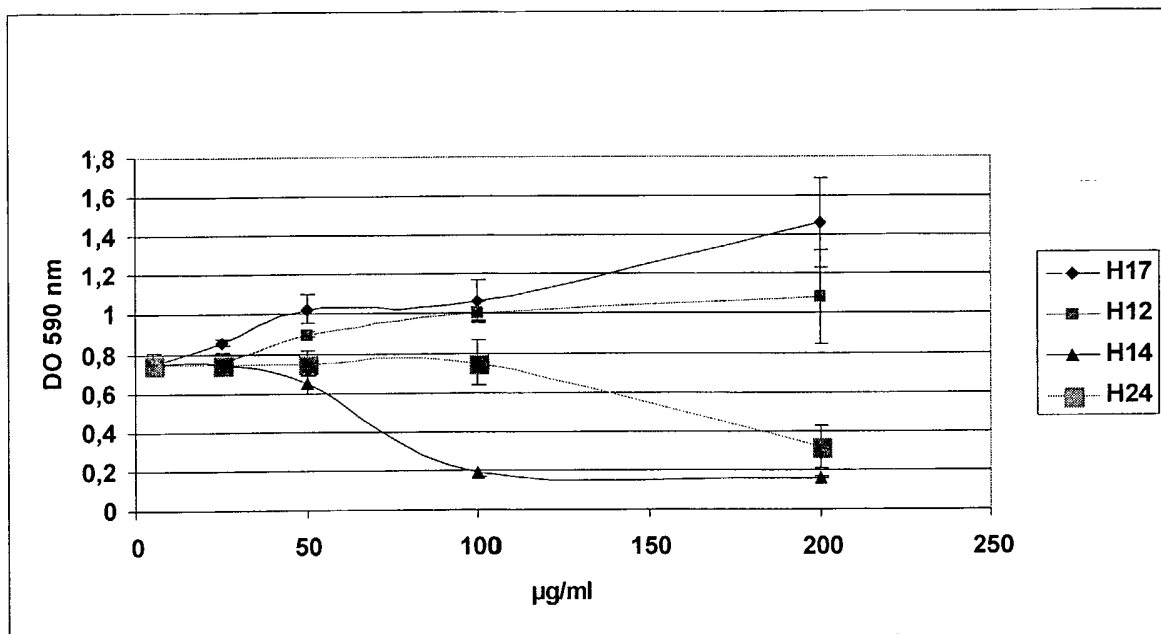


Fig.4

5/5

Fig.5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/02813

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K16/42 C12N15/13 A61K39/395 A61P37/00 A61P35/00
G01N33/577 G01N33/68

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>W. BURLINGHAM ET AL.: "HLA (A*0201) mimicry by anti-idiotypic monoclonal antibodies." THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 161, no. 12, 15 December 1998 (1998-12-15), pages 6705-6714, XP002197555 Baltimore, MD, États-Unis abstract page 6712, right-hand column, line 55 -page 6713, left-hand column, line 3 --- -/--</p>	1-11



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 October 2002

Date of mailing of the international search report

06/11/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 02/02813

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>F. PEROSA ET AL.: "Syngeneic anti-idiotypic antisera to murine monoclonal antibodies to monomorphic and polymorphic determinants of HLA class I antigens." THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 138, no. 7, 1 April 1987 (1987-04-01), pages 2202-2207, XP002197556 Baltimore, MD, États-Unis abstract</p>	1-3
X	<p>--- M. TSUJISAKI ET AL.: "A sandwich assay to detect and characterize syngeneic anti-idiotypic antibodies to murine anti-HLA and tumor associated antigen monoclonal antibodies." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 95, 1986, pages 47-55, XP002019033 Amsterdam, Pays-Bas page 48, left-hand column, line 15 - line 30 page 48, right-hand column, line 13 - line 36 tables</p>	1-3,11
A	<p>--- EP 0 498 767 A (CIBA-GEIGY AG) 12 August 1992 (1992-08-12) examples claims -----</p>	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 02/02813

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 498767	A	12-08-1992	AU 1025692 A 13-08-1992
		CA 2060626 A1	07-08-1992
		EP 0498767 A2	12-08-1992
		IE 920386 A1	12-08-1992
		JP 5292994 A	09-11-1993

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Del. de Internationale No
PCT/FR 02/02813

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07K16/42 C12N15/13 A61K39/395 A61P37/00 A61P35/00
G01N33/577 G01N33/68

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

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

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

CIB 7 C07K

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>W. BURLINGHAM ET AL.: "HLA (A*0201) mimicry by anti-idiotypic monoclonal antibodies." THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 161, no. 12, 15 décembre 1998 (1998-12-15), pages 6705-6714, XP002197555 Baltimore, MD, États-Unis abrégé page 6712, colonne de droite, ligne 55 -page 6713, colonne de gauche, ligne 3 --- -/--</p>	1-11

☒ 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

29 octobre 2002

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

06/11/2002

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, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Nooij, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dén e Internationale No

PCT/FR 02/02813

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>F. PEROSA ET AL.: "Syngeneic anti-idiotypic antisera to murine monoclonal antibodies to monomorphic and polymorphic determinants of HLA class I antigens."</p> <p>THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 138, no. 7, 1 avril 1987 (1987-04-01), pages 2202-2207, XP002197556 Baltimore, MD, États-Unis abrégé</p>	1-3
X	<p style="text-align: center;">---</p> <p>M. TSUJISAKI ET AL.: "A sandwich assay to detect and characterize syngeneic anti-idiotypic antibodies to murine anti-HLA and tumor associated antigen monoclonal antibodies."</p> <p>JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 95, 1986, pages 47-55, XP002019033 Amsterdam, Pays-Bas page 48, colonne de gauche, ligne 15 - ligne 30 page 48, colonne de droite, ligne 13 - ligne 36 tableaux</p>	1-3, 11
A	<p style="text-align: center;">---</p> <p>EP 0 498 767 A (CIBA-GEIGY AG) 12 août 1992 (1992-08-12) exemples revendications</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-11

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De e Internationale No

PCT/FR 02/02813

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 498767 A	12-08-1992	AU 1025692 A	13-08-1992
		CA 2060626 A1	07-08-1992
		EP 0498767 A2	12-08-1992
		IE 920386 A1	12-08-1992
		JP 5292994 A	09-11-1993
