

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :

2 909 092

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national :

06 10329

⑤① Int Cl⁸ : **C 07 K 16/28** (2006.01), A 61 K 39/395, A 61 P 35/00,
C 12 N 5/12, 5/20, C 12 P 21/08

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 24.11.06.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 30.05.08 Bulletin 08/22.

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

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *PIERRE FABRE MEDICAMENT
Société anonyme — FR.*

⑦② Inventeur(s) : *GOETSCH LILIANE, CORVAIA
NATHALIE et HAEUW JEAN FRANCOIS.*

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤④ **NOUVEAUX ANTICORPS ANTI-PROLIFERATION.**

⑤⑦ La présente invention concerne de nouveaux anti-
corps isolés, ou l'un de leurs composés dérivés ou frag-
ments fonctionnels capables d'inhiber la prolifération des
cellules tumorales in vitro et/ou in vivo, lesdits anticorps
ayant été obtenus par un criblage fonctionnel.

Plus particulièrement, la présente invention vise l'anti-
corps 6F4, spécifique de la protéine JAM-A, ainsi que son
utilisation pour le traitement du cancer. Sont également cou-
vertes les compositions pharmaceutiques comprenant de
tels anticorps.

FR 2 909 092 - A1



La présente invention est relative à de nouveaux anticorps, notamment monoclonaux d'origine murine, chimériques et humanisés, capables d'inhiber la croissance tumorale ainsi que les séquences d'acide aminé et nucléiques codant pour ces anticorps. Selon un aspect particulier, l'invention a pour objet de nouveaux anticorps, composés dérivés ou fragments fonctionnels, capables d'inhiber la prolifération des cellules tumorales. L'invention comprend également l'utilisation de ces anticorps à titre de médicament pour le traitement prophylactique et/ou thérapeutique des cancers ainsi que dans des procédés ou nécessaires de diagnostic des cancers. L'invention comprend enfin des compositions comprenant de tels anticorps en association avec d'autres composés anticancéreux, tels que des anticorps, ou conjugués avec des toxines et leur utilisation pour la prévention et/ou le traitement de certains cancers.

De manière générale, le critère retenu pour la génération d'anticorps monoclonaux est la reconnaissance de l'immunogène identifié comme cible potentielle d'un traitement. En pratique, des souris sont immunisées avec une protéine recombinante correspondant à l'immunogène et, après récupération des anticorps monoclonaux produits par la souris, ces derniers sont criblés dans un premier temps sur leur capacité à reconnaître l'immunogène de manière spécifique. Dans un deuxième temps, les anticorps ainsi sélectionnés sont testés *in vivo* et *in vitro* afin de déterminer leur activité ainsi que leurs propriétés et/ou mécanismes d'action.

Cette approche « traditionnelle », si elle permet de connaître dès le début la cible travaillée, entraîne souvent la génération d'un grand nombre d'anticorps qui sont certes capables de reconnaître spécifiquement une cible donnée mais qui ne présentent pas d'activité biologique significative *in vivo*. Dans le domaine du cancer, il est en effet connu que, même si un anticorps donne de bons résultats *in vitro*, cela n'implique pas forcément que ce même anticorps démontrera par la suite une réelle activité anti-tumorale *in vivo*.

La présente invention se différencie de cette manière de procéder, et va même à l'encontre de celle-ci, puisqu'elle repose sur une approche « fonctionnelle », et plus particulièrement sur un criblage primaire basé sur la fonction recherchée pour l'anticorps et non sur l'antigène reconnu.

Plus particulièrement, les inventeurs ont sélectionné une fonction donnée, à savoir l'inhibition de la prolifération basale, non induite, de la cellule, comme paramètre de sélection des anticorps.

Le procédé de génération utilisé sera décrit plus en détails dans les exemples plus loin.

De manière surprenante, par cette approche fonctionnelle, les inventeurs ont généré et sélectionné un anticorps, capable d'inhiber *in vitro* et/ou *in vivo*, de manière significative, la prolifération de cellules tumorales.

Selon un premier aspect, l'invention a pour objet un anticorps isolé, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels capable d'inhiber la prolifération de cellules tumorales *in vitro* et/ou *in vivo*, ledit anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, étant caractérisé en ce qu'il comprend au moins un CDR choisi parmi les CDRs de séquence SEQ ID No. 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 ou au moins un CDR dont la séquence présente au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec les séquences SEQ ID No. 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

Par « fragment fonctionnel » d'un anticorps selon l'invention, on entend désigner en particulier un fragment d'anticorps, tel que des fragments Fv, scFv (sc pour simple chaîne), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc ou diabodies, ou tout fragment dont la durée de demie-vie aurait été augmentée. De tels fragments fonctionnels seront décrits en détails plus loin dans la présente description.

Par « composé dérivé » d'un anticorps selon l'invention, on entend désigner en particulier une protéine de liaison comprenant une charpente peptidique ou « scaffold » et au moins l'un des CDRs de l'anticorps d'origine afin d'en conserver la capacité de reconnaissance. De tels composés dérivés sont bien connus de l'homme de l'art et seront décrits plus en détails dans la suite de la présente description.

De manière plus préférée, l'invention comprend les anticorps, leurs composés dérivés ou leurs fragments fonctionnels, selon la présente invention, notamment chimériques ou humanisés, obtenus par recombinaison génétique ou par synthèse chimique.

Selon une forme de réalisation préférée, l'anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'invention est caractérisé en ce qu'il consiste en un anticorps monoclonal.

Il faut entendre par « anticorps monoclonal » un anticorps issu d'une population
5 d'anticorps sensiblement homogènes. Plus particulièrement, les anticorps individuels d'une population sont identiques à l'exception de quelques mutations éventuelles pouvant se produire naturellement qui peuvent se retrouver en proportions minimales. En d'autres termes, un anticorps monoclonal consiste en un anticorps homogène résultant de la prolifération d'un seul clone cellulaire (par exemple un hybridome, une cellule
10 hôte eucaryote transfectée avec une molécule d'ADN codant pour l'anticorps homogène, une cellule hôte procaryote transfectée avec une molécule d'ADN codant pour l'anticorps homogène, etc.) et qui est généralement caractérisé par des chaînes lourdes d'une seule et même classe et sous-classe, et des chaînes légères d'un seul type. Les anticorps monoclonaux sont fortement spécifiques et sont dirigés contre un seul
15 antigène. En outre, contrairement aux préparations d'anticorps polyclonaux qui comprennent classiquement différents anticorps dirigés contre différents déterminants, ou épitopes, chaque anticorps monoclonal est dirigé contre un seul épitope de l'antigène.

Il doit être compris ici que l'invention ne concerne pas les anticorps sous forme naturelle, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas pris dans leur environnement naturel mais qu'ils
20 ont pu être isolés ou obtenus par purification à partir de sources naturelles, ou bien obtenus par recombinaison génétique, ou par synthèse chimique, et qu'ils peuvent alors comporter des acides aminés non naturels comme cela sera décrit plus loin.

Plus particulièrement, selon une forme d'exécution préférée de l'invention, l'anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, est caractérisé
25 en ce qu'il comprend une chaîne légère comprenant au moins une région CDR déterminant la complémentarité choisie parmi les CDRs de séquence d'acide aminé SEQ ID No. 1, 3 ou 5, ou au moins un CDR dont la séquence présente au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 1, 3 ou 5, ou en ce qu'il comprend une chaîne lourde comprenant
30 au moins un CDR choisi parmi les CDRs de séquence d'acide aminé SEQ ID No. 2, 4 ou 6, ou au moins un CDR dont la séquence présente au moins 80 %, de préférence

85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 2, 4 ou 6.

Plus particulièrement, l'anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend une chaîne lourde
5 comprenant au moins un des trois CDRs de séquence SEQ ID Nos. 2, 4 et 6, ou de séquence présentant au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec les séquences SEQ ID Nos. 2, 4 ou 6.

De manière encore plus préférée, l'anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend une
10 chaîne lourde comprenant deux des trois, de préférence les trois CDRs suivants :

- le CDR de séquence SEQ ID No. 2 ou de séquence présentant au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 2 ;

- le CDR séquence SEQ ID No. 4 ou de séquence présentant au moins 80 %, de
15 préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 4 ; et

- la séquence SEQ ID No. 6 ou une séquence présentant au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 6.

20 Selon un autre mode de réalisation, l'anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend une chaîne légère comprenant au moins un des trois CDRs de séquence SEQ ID Nos. 1, 3 et 5, ou de séquence présentant au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec les séquences SEQ ID Nos. 1, 3 ou 5.

25 De manière préférée, l'anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend une chaîne légère comprenant deux des trois, de préférence les trois CDRs suivants :

- le CDR de séquence SEQ ID No. 1 ou de séquence présentant au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la
30 séquence SEQ ID No. 1 ;

- le CDR de séquence SEQ ID No. 3 ou de séquence présentant au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 3 ; et
- la séquence SEQ ID No. 5 ou une séquence présentant au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 5.

Dans la présente description, les termes polypeptides, séquences polypeptidiques, peptides et protéines attachés aux composés anticorps ou à leur séquence sont interchangeables.

Il doit être compris ici que l'invention ne concerne pas les anticorps sous forme naturelle, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas pris dans leur environnement naturel mais qu'ils ont pu être isolés ou obtenus par purification à partir de sources naturelles, ou bien obtenus par recombinaison génétique, ou par synthèse chimique, et qu'ils peuvent alors comporter des acides aminés non naturels comme cela sera décrit plus loin.

Par région CDR ou CDR, on entend désigner les régions hypervariables des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines comme définies par Kabat et al. (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, and later editions). Il existe 3 CDRs de chaîne lourde et 3 CDRs de chaîne légère. Le terme CDR ou CDRs est utilisé ici pour désigner suivant les cas, l'une de ces régions ou plusieurs, voire l'ensemble, de ces régions qui contiennent la majorité des résidus d'acides aminés responsables de la liaison par affinité de l'anticorps pour l'antigène ou l'épitope qu'il reconnaît.

Par « pourcentage d'identité » entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acide aminé au sens de la présente invention, on entend désigner un pourcentage de nucléotides ou de résidus d'acides aminés identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement (alignement optimal), ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties au hasard et sur toute leur longueur. Les comparaisons de séquences entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acide aminé sont traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière optimale, ladite comparaison pouvant être réalisée par segment ou par « fenêtre de comparaison ». L'alignement optimal des

séquences pour la comparaison peut être réalisé, outre manuellement, au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Smith et Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Needleman et Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], au moyen de la méthode de recherche de similarité de Pearson et Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444], au moyen de logiciels informatiques utilisant ces algorithmes (GAP, BESTFIT, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, ou encore par les logiciels de comparaison BLAST N ou BLAST P).

Le pourcentage d'identité entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acide aminé est déterminé en comparant ces deux séquences alignées de manière optimale dans laquelle la séquence d'acide nucléique ou d'acide aminé à comparer peut comprendre des additions ou des délétions par rapport à la séquence de référence pour un alignement optimal entre ces deux séquences. Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide ou le résidu d'acide aminé est identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le pourcentage d'identité entre ces deux séquences.

Par exemple, on pourra utiliser le programme BLAST, « BLAST 2 sequences » (Tatusova et al., « Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences », FEMS Microbiol., 1999 Lett. 174:247-250) disponible sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, les paramètres utilisés étant ceux donnés par défaut (en particulier pour les paramètres « open gap pénalité » : 5, et « extension gap pénalité » : 2 ; la matrice choisie étant par exemple la matrice « BLOSUM 62 » proposée par le programme), le pourcentage d'identité entre les deux séquences à comparer étant calculé directement par le programme.

Par séquence d'acide aminé présentant au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité avec une séquence d'acide aminé de référence, on préfère celles présentant par rapport à la séquence de référence, certaines modifications, en particulier une délétion, addition ou substitution d'au moins un acide aminé, une troncation ou un allongement. Dans le cas d'une substitution, d'un ou plusieurs acide(s)

aminé(s) consécutif(s) ou non consécutif(s), on préfère les substitutions dans lesquelles les acides aminés substitués sont remplacés par des acides aminés « équivalents ». L'expression « acides aminés équivalents » vise ici à désigner tout acide aminé susceptible d'être substitué à l'un des acides aminés de la structure de base sans
 5 cependant modifier essentiellement les activités biologiques des anticorps correspondants et telles qu'elles seront définies par la suite, notamment dans les exemples.

Ces acides aminés équivalents peuvent être déterminés soit en s'appuyant sur leur homologie de structure avec les acides aminés auxquels ils se substituent, soit sur
 10 des résultats d'essais comparatifs d'activité biologique entre les différents anticorps susceptibles d'être effectués.

A titre d'exemple non limitatif, le tableau 1 ci-dessous reprend les possibilités de substitution susceptibles d'être effectuées sans qu'il en résulte une modification approfondie de l'activité biologique de l'anticorps modifié correspondant, les
 15 substitutions inverses étant naturellement envisageables dans les mêmes conditions.

Tableau 1

Résidu originel	Substitution(s)
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (G)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

Il est admis par l'homme de l'art, comme état de la technique, que la plus grande variabilité (longueur et composition) entre les 6 CDRs se retrouve chez les 3 CDRs de la chaîne lourde et, plus particulièrement, le CDR-H3 de cette chaîne lourde. Par conséquent, il sera évident que les CDRs caractéristiques préférés de l'anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'invention seront les 3 CDRs de la chaîne lourde, c'est-à-dire les CDRs codés respectivement par les séquences SEQ ID Nos. 2, 4 et 6 et, encore plus préférentiellement, le CDR correspondant au CDR-H3 codé par la séquence SEQ ID No. 6.

Dans un mode de réalisation particulier, la présente invention est relative à un anticorps murin, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'invention.

Selon une autre forme de réalisation de l'invention, il est décrit un anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels comprenant une chaîne légère comprenant les trois CDRs suivants :

- 15 - le CDR de séquence SEQ ID No. 1 ou de séquence présentant au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 1 ;
 - le CDR séquence SEQ ID No. 3 ou de séquence présentant au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 3 ; et
 - 20 - la séquence SEQ ID No. 5 ou une séquence présentant au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 5, et
- une chaîne lourde comprenant les trois CDRs suivants :
- 25 - la séquence SEQ ID No. 2 ou une séquence présentant au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 2 ;
 - la séquence SEQ ID No. 4 ou une séquence présentant au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID
 - 30 No. 4 ; et

- la séquence SEQ ID No. 6 ou une séquence présentant au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 6.

Selon encore une autre forme de réalisation, l'anticorps, ou l'un de ses composés
5 dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'invention, est caractérisé en ce qu'il comprend une chaîne légère de séquence comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 7 ou une séquence présentant au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 7, et en ce qu'il comprend une chaîne lourde de séquence comprenant la séquence d'acide aminé SEQ
10 ID No. 8 ou une séquence présentant au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 8.

Comme vu plus haut, l'invention vise également tout composé dérivé d'un anticorps selon l'invention.

Plus particulièrement, l'anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments
15 fonctionnels, selon l'invention, est caractérisé en ce que ledit composé dérivé consiste en une protéine de liaison comprenant une charpente peptidique sur laquelle est greffé au moins un CDR de manière à conserver tout ou partie des propriétés paratopiques de reconnaissance de l'anticorps initial.

Une ou plusieurs séquences parmi les 6 séquences des CDRs décrits dans cette
20 invention peuvent aussi être présentées sur des charpentes (ou « scaffold » selon la nomenclature anglaise) protéiques différentes des immunoglobulines. Dans ce cas, la séquence protéique permet de recréer un squelette peptidique favorable au repliement du ou des CDRs greffés, lui(leur) permettant de conserver leurs propriétés paratopiques de reconnaissance de l'antigène.

25 De manière générale, l'homme de l'art sait déterminer le type de charpente protéique sur laquelle greffer au moins l'un des CDRs issu(s) de l'anticorps originel. Plus particulièrement, il est connu que, pour être sélectionnées, de telles charpentes doivent répondre au plus grand nombre de critères tels qu'énumérés ci-dessous (Skerra A., J. Mol. Recogn., 2000, 13:167-187) :

30 - bonne conservation phylogénétique ;

- structure tri-dimensionnelle connue (comme par exemple par cristallographie, spectroscopie NMR ou toute autre technique connue de l'homme de l'art) ;
- petite taille ;
- 5 - peu ou pas de modifications post-transcriptionnelles ; et/ou
- facile à produire, à exprimer et à purifier.

L'origine de telles charpentes protéiques peut être, mais n'est pas limitée à des structures sélectionnées parmi : la fibronectine et préférentiellement le 10ème domaine de la fibronectine de type 3, la lipocaline, l'anticaline (Skerra A., J. Biotechnol., 2001, 10 74(4):257-75), la protéine Z issue du domaine B de la protéine A de *Staphylococcus aureus*, la thioredoxin A ou encore les protéines à motifs répétés de type « ankyrin repeat » (Kohl et al., PNAS, 2003, vol. 100, No. 4, 1700-1705), « armadillo repeat », « leucine-rich repeat » ou « tetratricopeptide repeat ».

Peuvent également être mentionnées les charpentes dérivées de toxines comme, 15 par exemple, les toxines suivantes issues de scorpions, insectes, plantes, mollusques, ... ou les inhibiteurs protéiques de la NO synthase neuronale (PIN).

Comme exemple, aucunement limitatif, de telles constructions hybrides, il peut être cité l'insertion du CDR-H1 (chaîne lourde) d'un anticorps anti-CD4, à savoir le 13B8.2, sur l'une des boucles de PIN, la nouvelle protéine de liaison ainsi obtenue 20 conservant les mêmes propriétés de liaison que l'anticorps d'origine (Bes et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, 343(1), 334-344). Peut également être mentionnée à titre illustratif la greffe du CDR-H3 (chaîne lourde) d'un anticorps VHH anti-lysozyme sur l'une des boucles de la neocarzinostatine (Nicaise et al., Protein Science, 2004, 13(7):1882-1891).

25 Enfin, comme décrit plus haut, de telles charpentes peptidiques peuvent comprendre de 1 à 6 CDR(s) issu(s) de l'anticorps d'origine. De manière préférée, mais sans aucune obligation, l'homme de l'art sélectionnera au moins un CDR issu de la chaîne lourde, cette dernière étant connue pour être principalement responsable de la spécificité de l'anticorps. La sélection du ou des CDR(s) pertinent(s) est évidente pour 30 l'homme de l'art, ce dernier mettant alors en œuvre des techniques connues (Bes et al., FEBS letters 508, 2001, 67-74).

- Sous un aspect particulier, la présente invention a pour objet un procédé de sélection d'un composé dérivé d'un anticorps selon l'invention, ledit composé dérivé étant capable d'inhiber *in vitro* et/ou *in vivo* la prolifération de cellules tumorales et ledit composé dérivé comprenant une charpente peptidique sur laquelle est greffé au moins
- 5 un CDR d'anticorps, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes ;
- a) la mise en contact *in vitro* d'un composé comprenant une charpente peptidique sur laquelle est greffé au moins un CDR d'anticorps avec un échantillon biologique contenant des cellules tumorales capables de proliférer et dans des conditions permettant à ces cellules de proliférer ; et
- 10 b) la sélection de ce composé si ce composé est capable d'inhiber la prolifération de ces cellules tumorales,
- et caractérisé en ce que ledit au moins CDR greffé est choisi parmi l'un au moins des 6 CDR suivants :
- le CDR de séquence SEQ ID No. 1 ou de séquence présentant au moins 80 %, de

15 préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 1 ;

 - le CDR de séquence SEQ ID No. 3 ou de séquence présentant au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 3 ;

20 - le CDR de séquence SEQ ID No. 5 ou de séquence présentant au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 5 ;

 - le CDR de séquence SEQ ID No. 2 ou de séquence présentant au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la

25 séquence SEQ ID No. 2 ;

 - le CDR de séquence SEQ ID No. 4 ou de séquence présentant au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 4 ; et
 - le CDR de séquence SEQ ID No. 6 ou de séquence présentant au moins 80 %, de

30 préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 6.

Selon un mode préféré, le procédé peut comprendre à l'étape a) la mise en contact *in vitro* d'un composé comprenant une charpente peptidique sur laquelle est greffé au moins deux ou trois CDR d'anticorps.

5 Selon un mode encore plus préféré de ce procédé, la charpente peptidique est choisie parmi les charpentes ou protéines de liaison dont les structures ont été citées ci-avant.

Bien évidemment, ces exemples ne sont aucunement limitatifs, et toute autre structure connue ou évidente pour l'homme de l'art doit être considérée comme faisant partie de la protection conférée par la présente demande de brevet.

10 La présente invention a donc pour objet un anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels caractérisé en ce que la charpente peptidique est sélectionnée parmi les protéines a) phylogénétiquement bien conservées, b) d'architecture robuste, c) avec une organisation moléculaire en trois dimensions bien connues, d) de petite taille et/ou e) comprenant des régions pouvant être modifiées par
15 délétion et/ou insertion sans modifications des propriétés de stabilité.

Selon une forme de réalisation préférée, l'anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'invention est caractérisé en ce que ladite charpente peptidique est sélectionnée parmi i) les charpentes issues de la fibronectine, préférentiellement le 10ème domaine de la fibronectine de type 3, la lipocaline,
20 l'anticaline, la protéine Z issue du domaine B de la protéine A de *Staphylococcus aureus*, la thioredoxin A, ii) les protéines à motifs répétés de type « ankyrin repeat », « armadillo repeat », « leucine-rich repeat » ou « tetratricopeptide repeat », ou encore iii) les inhibiteurs protéiques de la NO synthase neuronale (PIN).

25 Selon un autre aspect de l'invention, il est également fait mention des fragments fonctionnels de l'anticorps décrit plus haut.

Plus particulièrement, l'invention vise un anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'invention caractérisé en ce que ledit fragment fonctionnel est choisi parmi les fragments Fv, Fab, (Fab')₂, Fab', scFv, scFv-Fc et les diabodies, ou tout fragment dont la demie-vie aurait été augmentée comme des
30 fragments pégylés.

De tels fragments fonctionnels d'anticorps selon l'invention consistent, par exemple, en des fragments Fv, scFv (sc pour simple chaîne), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc ou diabodies, ou tout fragment dont la durée de demie-vie aurait été augmentée par modification chimique, comme l'ajout de poly(alkylène) glycol tel que le poly(éthylène)glycol (« PEGylation ») (fragments PEGylés appelés Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG ou Fab'-PEG) (« PEG » d'après la nomenclature anglaise Poly(Ethylene) Glycol), ou par incorporation dans un liposome, microsphères ou PLGA, lesdits fragments présentant au moins un des CDRs caractéristiques selon l'invention, et, notamment, en ce qu'il est capable d'exercer de manière générale une activité même partielle de l'anticorps dont il est issu.

De préférence, lesdits fragments fonctionnels seront constitués ou comprendront une séquence partielle de la chaîne variable lourde ou légère de l'anticorps dont ils sont dérivés, ladite séquence partielle étant suffisante pour retenir la même spécificité de liaison que l'anticorps dont elle est issue et une affinité suffisante, de préférence au moins égale à 1/100, de manière plus préférée à au moins 1/10 de celle de l'anticorps dont elle est issue.

Un tel fragment fonctionnel comportera au minimum 5 acides aminés, de préférence 6, 7, 8, 10, 15, 25, 50 et 100 acides aminés consécutifs de la séquence de l'anticorps dont il est issu.

De préférence, ces fragments fonctionnels seront des fragments de type Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, F(ab'), scFv-Fc ou diabodies, qui possèdent généralement la même spécificité de fixation que l'anticorps dont ils sont issus. Selon la présente invention, des fragments d'anticorps de l'invention peuvent être obtenus à partir des anticorps tels que décrits précédemment par des méthodes telles que la digestion par des enzymes, comme la pepsine ou la papaïne et/ou par clivage des ponts disulfures par réduction chimique. D'une autre manière les fragments d'anticorps compris dans la présente invention peuvent être obtenus par des techniques de recombinaisons génétiques bien connues également de l'homme de l'art ou encore par synthèse peptidique au moyen par exemple de synthétiseurs automatiques de peptides tels que ceux fournis par la société Applied Biosystems, etc..

L'invention vise également l'anticorps murin originel, à savoir un anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'invention caractérisé en ce que ledit anticorps est un anticorps murin et en ce qu'il comprend une chaîne légère de séquence d'acide aminé SEQ ID No. 9, ou de séquence présentant au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la

5 séquence SEQ ID No. 9, et une chaîne lourde de séquence d'acide aminé SEQ ID No. 10, ou de séquence présentant au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 10.

Pour plus de clarté, le tableau 2 ci-dessous regroupe les différentes séquences en acides aminés correspondant à l'anticorps selon l'invention.

10

Tableau 2

Anticorps	Chaîne lourde	Chaîne légère	SEQ ID N°
6F4		CDR 1	1
		CDR 2	3
		CDR 3	5
	CDR 1		2
	CDR 2		4
	CDR 3		6
		domaine variable	7
	domaine variable		8
		entière	9
	entière		10

Sous un aspect également particulier, la présente invention est relative à un anticorps chimérique, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon

15 l'invention, caractérisé en ce que ledit anticorps comprend en outre les régions constantes de chaîne légère et de chaîne lourde dérivées d'un anticorps d'une espèce hétérologue à la souris, notamment de l'Homme.

Selon encore un autre aspect de l'invention, l'anticorps humanisé, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, est caractérisé en ce que les régions

20 constantes de chaîne légère et de chaîne lourde dérivées d'un anticorps humain sont respectivement la région lambda ou kappa et gamma-1, gamma-2 ou gamma-4.

Selon un autre aspect, l'invention est relative à un hybridome murin capable de sécréter un anticorps monoclonal selon la présente invention, notamment l'hybridome d'origine murine tel que déposé au Centre National de Culture de Microorganisme

(CNCM) (Institut Pasteur, Paris, France) le 6 juillet 2006 sous le numéro I-3646. Ledit hybridome a été obtenu par fusion de splénocytes de souris immunisées Balb/c et de lignées cellulaires de myélome Sp 2/O-Ag 14.

L'anticorps monoclonal dénommé ici 6F4, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, caractérisé en ce que ledit anticorps est sécrété par l'hybridome déposé à la CNCM le 4 juillet 2006 sous le numéro I-3646 fait bien entendu partie de la présente invention.

Sont également compris par anticorps selon la présente invention, les anticorps chimériques ou humanisés.

Par anticorps chimérique, on entend désigner un anticorps qui contient une région variable (chaîne légère et chaîne lourde) naturelle dérivée d'un anticorps d'une espèce donnée en association avec les régions constantes de chaîne légère et chaîne lourde d'un anticorps d'une espèce hétérologue à ladite espèce donnée.

Les anticorps ou leurs fragments de type chimérique selon l'invention peuvent être préparés en utilisant les techniques de recombinaison génétique. Par exemple, l'anticorps chimérique pourra être réalisé en clonant un ADN recombinant comportant un promoteur et une séquence codant pour la région variable d'un anticorps monoclonal non humain, notamment murin, selon l'invention, et une séquence codant pour la région constante d'anticorps humain. Un anticorps chimérique de l'invention codé par un tel gène recombinant sera par exemple une chimère souris-homme, la spécificité de cet anticorps étant déterminée par la région variable dérivée de l'ADN murin et son isotype déterminé par la région constante dérivée de l'ADN humain. Pour les méthodes de préparation d'anticorps chimériques, on pourra par exemple se référer au document Verhoeyn et al. (BioEssays, 8:74, 1988).

Par anticorps humanisés, 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 dérivée d'un (ou de plusieurs) anticorps humains. En outre, certains des résidus des segments du squelette (dénommés FR) peuvent être modifiés pour conserver l'affinité de liaison (Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986 ; Verhoeyn et al., Science, 239:1534-1536, 1988 ; Riechmann et al., Nature, 332:323-327, 1988).

Les anticorps humanisés selon l'invention ou leurs fragments peuvent être préparés par des techniques connues de l'homme de l'art (comme par exemple celles décrites dans les documents Singer et al., J. Immun. 150:2844-2857, 1992 ; Mountain et al., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10:1-142, 1992 ; ou Bebbington et al., Bio/Technology, 10:169-175, 1992). De tels 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*. D'autres techniques d'humanisation sont également connues de l'homme de l'art comme par exemple la technique du « CDR Grafting » décrite par PDL faisant l'objet des brevets EP 0 451 261, EP 0 682 040, EP 0 939 127, EP 0 566 647 ou encore US 5,530,101, US 6,180,370, US 5,585,089 et US 5,693,761. On peut également citer les brevets US 5,639,641 ou encore 6,054,297, 5,886,152 et 5,877,293.

En outre, l'invention vise également l'anticorps humanisé issu de l'anticorps murin décrit ci-dessus.

Plus particulièrement, le procédé d'humanisation de l'anticorps 6F4 est décrit en détails dans les exemples 2 et 3, respectivement pour les chaînes légère et lourde.

De manière préférée, les régions constantes de chaîne légère et de chaîne lourde dérivées d'un anticorps humain sont respectivement la région lambda ou kappa et gamma-1, gamma-2 ou gamma-4.

Dans la forme d'exécution correspondant à l'isotype IgG1, une caractéristique supplémentaire de l'anticorps est de présenter des fonctions effectrices comme l'ADCC (d'après la nomenclature anglaise « Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity ») et/ou la CDC (d'après la nomenclature anglaise « Complement Dependent Cytotoxicity »).

Selon un autre aspect de l'invention, la Demanderesse a dans un second temps identifié l'antigène reconnue par l'anticorps selon l'invention.

Le procédé mis en œuvre pour ce faire est décrit en détails dans l'exemple 4 plus loin.

JAM-A est une protéine membranaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines (IgSF) et, au sein de celle-ci, elle fait partie de la famille des JAM ou « junctional adhesion molecules ». Chez l'homme, la famille JAM comporte plusieurs membres dont les protéines JAM-A, JAM-B, JAM-C, A33 et A34. Parmi les membres

de la famille JAM, JAM-A présente l'homologie la plus élevée avec JAM-B et JAM-C, avec environ 35 % d'identité de séquence en acides aminés et 45 % de similitude avec ces 2 protéines. La protéine JAM-A est aussi appelée JAM A, F11R, F11 receptor, JAM-1, JAM 1, PAM-1 ou encore CD321.

5 Deux isoformes du précurseur de JAM-A différant par la longueur de la région extracellulaire ont été identifiées :

- isoforme a : 299 acides aminés (SEQ ID No. 41)

- isoforme b : 259 acides aminés (SEQ ID No. 43)

Les séquences nucléotidiques de ces deux isoformes sont représentées respectivement
10 aux SEQ ID No. 42 pour l'isoforme a et SEQ ID No. 44 pour l'isoforme b.

La protéine exprimée à la surface des cellules humaines possède une seule chaîne polypeptidique avec un domaine C-terminal intracellulaire, un unique domaine transmembranaire (21 acides aminés) et une région extracellulaire N-terminale comportant 2 domaines « Ig-like ».

15 JAM-A possède un site de N-glycosylation, résidu Asn en position 185 pour l'isoforme a et 145 pour l'isoforme b, et 2 ponts disulfure entre les résidus Cys 50 et 109 au niveau du domaine Ig N-terminal et les résidus Cys 153 et 212 au niveau du second domaine Ig.

La présence des 2 domaines Ig-like extracellulaires a été confirmée par
20 cristallographie (Kostrewa *et al.*, 2001, EMBO J. 16:4391-4398 ; Prota *et al.*, 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:5366-5371). Ces 2 domaines sont reliés par un linker tripeptidique (séquence VLV [127-129], isoforme a). Ces études structurales ont par ailleurs confirmé l'implication de JAM-A dans des interactions de type homophile à la surface cellulaire impliquant la région extracellulaire, cette région produite sous
25 forme recombinante étant capable de former des homodimères en solution (Bazzoni *et al.*, 2000, J. Biol. Chem. 275:30970-30976), et ont aussi permis d'identifier les acides aminés impliqués dans ces interactions : Arg 59, Glu 61, Lys 63, Leu 72, Tyr 75, Met 110, Glu 114, Tyr 119 et Glu 121. Le tripeptide RVE [59-61] est relativement conservé au sein de la famille JAM (RLE pour JAM-B, RIE pour JAM-C), et constituerait le
30 motif minimal pour la formation d'homodimères (Kostrewa *et al.*, 2001, EMBO J. 16:4391-4398).

Dans les cellules épithéliales et endothéliales, JAM-A est principalement localisée au niveau des jonctions serrées (Liu *et al.*, 2000, *J. Cell Sci.* 113:2363-2374). La région cytoplasmique contient un domaine PDZ de type II en position C-terminale (séquence FLV [298-300], isoforme a), qui serait responsable de l'interaction de JAM-A avec différentes protéines cytosoliques associée à la jonction serrée, contenant aussi un domaine PDZ, telles que ZO-1, AF-6, MUPP-1 et PAR-3 (Ebnet *et al.*, 2000, *J. Biol. Chem.* 275:27979-27988 ; Itoh *et al.*, 2001, *J. Cell Biol.* 154:491-498 ; Hamazaki *et al.*, 2002, *J. Biol. Chem.* 277:455-461). Des anticorps murins dirigés contre la région [111-123] impliquée dans la formation de dimères, anticorps appelés J3F.1 et J10.4, sont capables d'inhiber l'homodimérisation de JAM-A et la reconstruction de la barrière épithéliale *in vitro* (Mandell *et al.*, 2004, *J. Biol. Chem.* 279:16254-16262).

JAM-A interagit avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et est impliqué dans la migration des cellules endothéliales sur la vitronectine, ligand de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Naik et Naik, 2005, *J. Cell Sci.* 119:490-499). L'anticorps anti-JAM-A J3F.1 inhibe, de la même manière qu'un anticorps anti- $\alpha_v\beta_3$, la migration des cellules endothéliales et l'angiogénèse induite *in vitro* par le bFGF (Naik *et al.*, 2003, *Blood* 102:2108-2114). Différentes voies de signalisation ont été mises en évidence dans les cellules endothéliales : MAP kinases, PI3-kinase et PKC (Naik et Naik, 2005, *J. Cell Sci.* 119:490-499 ; Naik *et al.*, 2003, *Blood* 102:2108-2114 ; Naik *et al.*, 2003, *Artheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:2165-2171).

JAM-A est aussi exprimée dans les monocytes, les lymphocytes, les neutrophiles et les plaquettes (Williams *et al.*, 1999, *Mol. Immunol.* 36:1175-1188). La protéine JAM-A a d'ailleurs été identifiée initialement comme récepteur de l'anticorps F11, anticorps capable d'activer les plaquettes et d'induire leur agrégation (Naik *et al.*, 1995, *Biochem. J.* 310:155-162 ; Sobocka *et al.*, 2000, *Blood* 95:2600-2609). Les peptides [28-60] et [97-109] font partie de l'épitope de l'anticorps F11, et sont impliquées dans les phénomènes d'activation et d'agrégation plaquettaire, et d'homodimérisation (Babinska *et al.*, 2002, *Thromb. Haemost.* 87:712-721).

L'anticorps de rat BV11, dirigé contre la forme murine de JAM-A, inhibe la migration trans-endothéliale de monocytes *in vitro* et *in vivo* (Del Maschio *et al.*, 1999, *J. Exp. Med.* 190:1351-1356). Ostermann et collaborateurs (2002, *Nature Immunol.*

3:151-158) ont montré que JAM-A était un ligand de l'intégrine $\alpha_1\beta_2$ ou LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1), qui est sur-exprimée en réponse à certaines chémokines lors du développement d'une réponse anti-inflammatoire et nécessaire au phénomène de diapédèse ou migration des leucocytes sur le site de l'inflammation.

5 JAM-A, via le second domaine Ig-like, contribue à l'adhésion et à la migration trans-endothéliale des lymphocytes T et des neutrophiles (Ostermann *et al.*, 2002, Nature Immunol. 3:151-158), et jouerait donc un rôle important dans le recrutement des leucocytes sur le site de l'inflammation.

La protéine JAM-A est aussi impliquée les phénomènes d'infection virale. JAM-
10 A est en effet un récepteur des réovirus, virus responsables de certains types d'encéphalites, par le biais d'interactions avec la protéine d'attachement $\sigma 1$ (Barton *et al.*, 2001, Cell 104:441-451). L'anticorps anti-JAM-A J10.4 inhibe la fixation des réovirus sur JAM-A (Forrest *et al.*, 2003, J. Biol. Chem. 278:48434-48444).

A ce jour, aucun des anticorps mentionnés plus haut et dirigés contre le forme
15 humaine de JAM A ne montre une activité *in vivo* et, encore moins une activité anti-tumoral. Ces anticorps ne sont utilisés qu'à titre d'outils de recherche. Il existe donc un réel manque dans l'art antérieur d'un anticorps anti-tumoral actif *in vitro* et *in vivo*.

Selon un aspect particulier, l'anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'invention est caractérisé en ce qu'il est capable de se lier
20 spécifiquement à la protéine JAM-A (d'après la nomenclature anglaise « Junctional Adhesion Molecules »).

Selon encore un autre aspect, l'anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'invention est caractérisé en ce qu'il présente un K_D pour JAM A compris entre environ 1 nM et environ 1 pM. De manière plus préférée, ledit K_D
25 pour JAM A est compris entre environ 10 pM et environ 40 pM.

L'expression « K_D » se réfère à la constante de dissociation d'un complexe anticorps-antigène donné. $K_D = K_{off} / K_{on}$ avec K_{off} consistant en la constante « off rate » pour la dissociation de l'anticorps du complexe anticorps-antigène et K_{on} consistant en le niveau auquel l'anticorps s'associe à l'antigène (Chen Y. et al., 1999, J.Mol.Biol.,
30 293:865-881).

Sous un nouvel aspect, la présente invention est relative à un acide nucléique isolé caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les acides nucléiques suivants :

- a) un acide nucléique, ADN ou ARN, codant pour un anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'invention ;
- 5 b) un acide nucléique complémentaire d'un acide nucléique tel que défini en a) ;
- c) un acide nucléique d'au moins 18 nucléotides capable d'hybrider dans des conditions de forte stringence avec au moins l'un des CDRs de séquence d'acide nucléique SEQ ID No. 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 ou avec une séquence présentant au
- 10 moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 %, d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 ; et
- d) un acide nucléique d'au moins 18 nucléotides capable d'hybrider dans des conditions de forte stringence avec au moins la chaîne légère de séquence d'acides nucléiques SEQ ID No. 17 et/ou la chaîne lourde de séquence d'acides nucléiques SEQ
- 15 ID No. 18, ou avec une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 17 et/ou 18.

Le tableau 3 ci-dessous regroupe les différents séquences nucléotidiques concernant l'anticorps selon l'invention.

Tableau 3

Anticorps	Chaîne lourde	Chaîne légère	SEQ ID N°
6F4		CDR 1	11
		CDR 2	13
		CDR 3	15
	CDR 1		12
	CDR 2		14
	CDR 3		16
		domaine variable	17
	domaine variable		18
		entière	19
	entière	20	

Par acide nucléique, séquence nucléique ou d'acide nucléique, polynucléotide, oligonucléotide, séquence de polynucléotide, séquence nucléotidique, termes qui seront employés indifféremment dans la présente description, on entend désigner un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir un fragment

ou une région d'un acide nucléique, comportant ou non des nucléotides non naturels, et pouvant correspondre aussi bien à un ADN double brin, un ADN simple brin que des produits de transcription desdits ADNs.

Il doit être aussi compris ici que la présente invention ne concerne pas les séquences nucléotidiques dans leur environnement chromosomique naturel, c'est-à-dire à l'état naturel. Il s'agit de séquences qui ont été isolées et/ou purifiées, c'est-à-dire qu'elles ont été prélevées directement ou indirectement, par exemple par copie, leur environnement ayant été au moins partiellement modifié. On entend ainsi également désigner ici les acides nucléiques isolés obtenus par recombinaison génétique au moyen par exemple de cellules hôtes ou obtenus par synthèse chimique.

Par séquences nucléiques présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 %, après alignement optimal avec une séquence de préférence, on entend désigner les séquences nucléiques présentant, par rapport à la séquence nucléique de référence, certaines modifications comme en particulier une délétion, une troncation, un allongement, une fusion chimérique et/ou une substitution, notamment ponctuelle. Il s'agit de préférence de séquences dont les séquences codent pour les mêmes séquences d'acides aminés que la séquence de référence, ceci lié à la dégénérescence du code génétique, ou de séquences complémentaires qui sont susceptibles de s'hybrider spécifiquement avec les séquences de référence de préférence dans des conditions de forte stringence notamment telles que définies ci-après.

Une hybridation dans des conditions de forte stringence signifie que les conditions de température et de force ionique sont choisies de telle manière qu'elles permettent le maintien de l'hybridation entre deux fragments d'ADN complémentaires. A titre illustratif, des conditions de forte stringence de l'étape d'hybridation aux fins de définir les fragments polynucléotidiques décrits ci-dessus, sont avantageusement les suivantes.

L'hybridation ADN-ADN ou ADN-ARN est réalisée en deux étapes : (1) préhybridation à 42°C pendant 3 heures en tampon phosphate (20 mM, pH 7,5) contenant 5 x SSC (1 x SSC correspond à une solution 0,15 M NaCl + 0,015 M citrate de sodium), 50 % de formamide, 7 % de sodium dodécyl sulfate (SDS), 10 x Denhardt's, 5 % de dextran sulfate et 1 % d'ADN de sperme de saumon ; (2)

hybridation proprement dite pendant 20 heures à une température dépendant de la taille de la sonde (i.e. : 42°C, pour une sonde de taille > 100 nucléotides) suivie de 2 lavages de 20 minutes à 20°C en 2 x SSC + 2 % SDS, 1 lavage de 20 minutes à 20°C en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS. Le dernier lavage est pratiqué en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS pendant 30 minutes à 60°C pour une sonde de taille > 100 nucléotides. Les conditions d'hybridation de forte stringence décrites ci-dessus pour un polynucléotide de taille définie, peuvent être adaptées par l'homme du métier pour des oligonucléotides de taille plus grande ou plus petite, selon l'enseignement de Sambrook et al. (Molecular cloning : a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory; 3rd edition, 2001).

10 L'invention est également relative à un vecteur comprenant un acide nucléique selon la présente invention.

L'invention vise notamment les vecteurs de clonage et/ou d'expression qui contiennent une séquence nucléotidique selon l'invention.

Les vecteurs selon l'invention comportent de préférence des éléments qui permettent l'expression et/ou la sécrétion des séquences nucléotidiques dans une cellule hôte déterminée. Le vecteur doit alors comporter un promoteur, des signaux d'initiation et de terminaison de la traduction, ainsi que des régions appropriées de régulation de la transcription. Il doit pouvoir être maintenu de façon stable dans la cellule hôte et peut éventuellement posséder des signaux particuliers qui spécifient la sécrétion de la protéine traduite. Ces différents éléments sont choisis et optimisés par l'homme du métier en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être insérées dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi, ou être des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi.

De tels vecteurs sont préparés par des méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones résultant peuvent être introduits dans un hôte approprié par des méthodes standards, telles que la lipofection, l'électroporation, le choc thermique, ou des méthodes chimiques.

Les vecteurs selon l'invention sont par exemple des vecteurs d'origine plasmidique ou virale. Ils sont utiles pour transformer des cellules hôtes afin de cloner ou d'exprimer les séquences nucléotidiques selon l'invention.

L'invention comprend également les cellules hôtes transformées par ou comprenant un vecteur selon l'invention.

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

L'invention concerne également les animaux, excepté l'Homme, qui comprennent une cellule transformée selon l'invention.

Sous un autre aspect, l'invention a pour objet un procédé de production d'un
10 anticorps, ou l'un de ses fragments fonctionnels selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) la culture dans un milieu et conditions de culture appropriés d'une cellule hôte selon l'invention ; et
- b) la récupération desdits anticorps, ou l'un de ses fragments fonctionnels, ainsi produits
15 à partir du milieu de culture ou desdites cellules cultivées.

Les cellules transformées selon l'invention sont utilisables dans des procédés de préparation de polypeptides recombinants selon l'invention. Les procédés de préparation d'un polypeptide selon l'invention sous forme recombinante, caractérisés en ce qu'ils mettent en œuvre un vecteur et/ou une cellule transformée par un vecteur selon
20 l'invention sont eux-mêmes compris dans la présente invention. De préférence, on cultive une cellule transformée par un vecteur selon l'invention dans des conditions qui permettent l'expression dudit polypeptide et on récupère ledit peptide recombinant.

Ainsi qu'il a été dit, l'hôte cellulaire peut être choisi parmi des systèmes procaryotes ou eucaryotes. En particulier, il est possible d'identifier des séquences
25 nucléotidiques selon l'invention, facilitant la sécrétion dans un tel système procaryote ou eucaryote. Un vecteur selon l'invention portant une telle séquence peut donc être avantageusement utilisé pour la production de protéines recombinantes, destinées à être sécrétées. En effet, la purification de ces protéines recombinantes d'intérêt sera facilitée par le fait qu'elles sont présentes dans le surnageant de la culture cellulaire plutôt qu'à
30 l'intérieur des cellules hôtes.

On peut également préparer les polypeptides selon l'invention par synthèse chimique. Un tel procédé de préparation est également un objet de l'invention. L'homme du métier connaît les procédés de synthèse chimique, par exemple les techniques mettant en œuvre des phases solides (voir notamment Steward et al., 1984, 5 Solid phase peptides synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2ème éd.) ou des techniques utilisant des phases solides partielles, par condensation de fragments ou par une synthèse en solution classique. Les polypeptides obtenus par synthèse chimique et pouvant comporter des acides aminés non naturels correspondants sont également compris dans l'invention.

10 Les anticorps, ou l'un de leurs composés dérivés ou fragments fonctionnels, susceptibles d'être obtenus par un procédé selon l'invention sont également compris dans la présente invention.

Selon encore un autre aspect, la présente invention concerne un anticorps tel que décrit plus haut, caractérisé en ce qu'il est, en outre, capable de se lier spécifiquement 15 sur un récepteur humain de la famille des récepteurs à tyrosine kinase et/ou capable d'inhiber spécifiquement l'activité tyrosine kinase d'un tel récepteur.

Selon une nouvelle forme de réalisation, l'invention a pour objet un anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels consistant en un anticorps bispécifique en ce sens qu'il comprend un second motif capable d'interagir avec 20 n'importe quel récepteur impliqué dans le développement des tumeurs comme, par exemple, VEGFR, VEGF, EGFR, IGF-1R, HER2neu, HGF, cMET, FGF, les tetraspanines, les intégrines, CXCR4 ou CXCR2.

Selon une première forme d'exécution, un tel anticorps consiste en un anticorps bispécifique, et comprend un second motif inhibant spécifiquement la fixation de l'EGF 25 sur le récepteur humain du facteur de croissance de l'épiderme EGFR et/ou inhibant spécifiquement l'activité tyrosine kinase dudit récepteur EGFR. Selon un aspect encore plus préféré de l'invention, ledit second motif anti-EGFR est issu de l'anticorps monoclonal cetuximab (C225 ou erbitux), matuzumab, huR3, HuMax-EGFR ou panitumab.

30 Selon une deuxième forme d'exécution, l'anticorps selon l'invention consiste en un anticorps bispécifique, et comprend un second motif inhibant spécifiquement

l'activité modulée par le récepteur HER2/neu et/ou inhibant spécifiquement l'activité tyrosine kinase dudit récepteur HER2/neu. Plus particulièrement, ledit second motif anti-HER2/neu est issu de l'anticorps monoclonal de souris 4D5 ou 2C4 ou de l'anticorps humanisé Trastuzumab ou Pertuzumab.

5 Selon une troisième forme d'exécution, l'anticorps selon l'invention consiste en un anticorps bispécifique, et comprend un second motif inhibant spécifiquement la fixation de l'Hepatocyte Growth Factor (HGF) sur le récepteur cMET et/ou inhibant spécifiquement l'activité tyrosine kinase dudit récepteur cMET.

Selon une quatrième forme d'exécution, l'anticorps selon l'invention consiste en
10 un anticorps bispécifique, et comprend un second motif inhibant spécifiquement l'activité modulée par le récepteur IGF-1R et/ou inhibant spécifiquement l'activité tyrosine kinase dudit récepteur IGF-1R. Plus particulièrement, ledit second motif anti-IGF-1R est issu de l'anticorps monoclonal de souris 7C10 ou de l'anticorps humanisé correspondant h7C10 (Goetsch et al., demande internationale de brevet publiée sous le
15 numéro WO 03/059951) ou bien encore des anticorps hEM164 (Maloney et al., Cancer Res., 2003, 63(16):5073-5083), des anticorps anti-IGF-1R de la société Abgenix (voir demande de brevet américain publiée sous le numéro US 2005/281812), Mab 39, 1H7 (Li et al., Cancer Immunol. Immunother., 2000, 49(4-5):243-252) ou 4G11 (Jackson-Booth et al., Horm. Metab. Res., 2003, 35(11-12):850-856).

20 Enfin, selon une dernière forme d'exécution, l'anticorps selon l'invention consiste en un anticorps bispécifique et comprend un second motif capable d'interagir avec tout type de récepteur pouvant être impliqué dans le développement des tumeurs comme, à titre d'exemples non limitatifs, le VEGFR, le VEGF, le FGF (d'après la nomenclature anglaise « fibroblast growth factor ») ou encore tout membre de la famille
25 CXCR (pour « chemokine receptor ») comme CXCR2 ou CXCR4.

Peuvent être également mentionnés les anticorps anti-CD20 comme rituximab, ibritumomab ou tositumomab ; les anticorps anti-CD33 comme gemtuzumab ou lintuzumab ; les anticorps anti-CD22 comme epratuzumab ; les anticorps anti-CD52 comme alemtuzumab ; les anticorps anti-EpCAM comme edrecolomab, Ch 17-1A ou
30 IGN-101 ; les anticorps anti-CTP21 ou 16 comme Xactin ; les anticorps anti-DNA-Ag comme ¹³¹I-Cotara TNT-1 ; les anticorps anti-MUC1 comme pentumomab ou R1150 ;

les anticorps anti-MUC18 comme ABX-MA1 ; les anticorps anti-GD3 comme mitumomab ; les anticorps anti-CEA comme CeaVac ou labetuzumab ; les anticorps anti-CA125 comme OvaRex ; les anticorps anti-HLA-DR comme apolizumab ; les anticorps anti-CTLA4 comme MDX-010 ; les anticorps anti-PSMA comme MDX-070,
5 ^{111}In & ^{90}Y -J591, ^{177}Lu J591, J591-DM1 ; les anticorps anti-Lewis Y comme IGN311 ; les anticorps anti-angiogénèse comme AS1405 et ^{90}Y muBC1 ; les anticorps anti-Trail-R1 comme TRAIL R1mAb ou TRAIL R2mAb.

Les anticorps bispécifiques ou bifonctionnels constituent une seconde génération d'anticorps monoclonaux dans lesquels deux régions variables différentes sont
10 combinées dans la même molécule (Hollinger and Bohlen, 1999, *Cancer and metastasis*, rev. 18:411-419). Leur utilité a été mise en évidence tant dans le domaine du diagnostic que dans le domaine de la thérapie de par leur capacité à recruter de nouvelles fonctions effectrices ou à cibler plusieurs molécules à la surface de cellules tumorales. Ces anticorps peuvent être obtenus par des méthodes chimiques (Glennie MJ et al., 1987, *J.*
15 *Immunol.* 139, 2367-2375 ; Repp R. et al., 1995, *J. Hemat.*, 377-382) ou somatiques (Staerz U.D. and Bevan M.J., 1986, *PNAS* 83, 1453-1457 ; Suresh M.R. et al., 1986, *Method Enzymol.*, 121:210-228) mais également et préférentiellement par des techniques d'ingénierie génétique qui permettent de forcer l'hétérodimérisation et facilitent ainsi le procédé de purification de l'anticorps recherché (Merchand et al.,
20 1998, *Nature Biotech.*, 16:677-681).

Ces anticorps bispécifiques peuvent être construits comme des IgG entières, comme des Fab'2 bispécifiques, comme des Fab'PEG ou comme des diabodies ou encore comme des scFv bispécifiques mais également comme un anticorps bispécifique tétravalent où deux sites de fixation sont présents pour chaque antigène ciblé (Park et
25 al., 2000, *Mol. Immunol.*, 37(18):1123-30) ou ses fragments comme décrit plus haut.

Outre un avantage économique du fait que la production et l'administration d'un anticorps bispécifique soient moins onéreuses que la production de deux anticorps spécifiques, l'utilisation de tels anticorps bispécifiques a pour avantage de réduire la toxicité du traitement. En effet, l'utilisation d'un anticorps bispécifique permet de
30 diminuer la quantité globale d'anticorps circulants et, par suite, la toxicité éventuelle.

Dans une forme de réalisation préférée de l'invention, l'anticorps bispécifique est un anticorps bivalent ou tétravalent.

Enfin, la présente invention vise l'anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, tel que décrit plus haut à titre de médicament.

5 L'invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant à titre de principe actif un composé consistant en un anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'invention. De préférence, ledit anticorps est additionné d'un excipient et/ou d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Selon encore une autre forme d'exécution, la présente invention concerne
10 également une composition pharmaceutique telle que décrite plus haut qui comprend au moins un deuxième composé anti-tumoral pouvant être choisi parmi les composés capables d'inhiber spécifiquement l'activité tyrosine kinase des récepteurs IGF-IR, EGFR, HER2/neu, cMET, VEGFR, VEGF, etc., ou tout autre composé anti-tumoral connu de l'homme de l'art. Dans un deuxième aspect préféré de l'invention, ledit
15 deuxième composé peut être choisi parmi les anticorps anti-EGFR, anti-IGF-IR, anti-HER2/neu, anti-cMET, VEGFR, VEGF, etc., isolés, ou leurs fragments fonctionnels et composés dérivés, capables d'inhiber l'activité proliférative et/ou anti-apoptotique et/ou angiogénique et/ou inductrice de dissémination métastatique promues par lesdits récepteurs.

20 Selon encore une forme d'exécution de l'invention, la composition comprend, en outre, comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, au moins un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase des récepteurs IGF-IR, EGFR, HER2/neu, cMET, VEGFR, etc..

Dans un autre mode de réalisation préféré, ledit inhibiteur de l'activité tyrosine
25 kinase de ces récepteurs est sélectionné dans le groupe consistant en des agents naturels dérivés, des dianilinophthalimides, des pyrazolo- ou pyrrolo-pyridopyrimidines ou encore des quinazolines. De tels agents inhibiteurs sont bien connus de l'homme de l'art et décrits dans la littérature (Ciardiello F., Drugs 2000, Suppl. 1, 25-32).

Une autre forme d'exécution complémentaire de l'invention consiste en une
30 composition telle que décrite plus haut qui comprend, en outre, comme produit de

combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, un agent cytotoxique/cytostatique.

On entend par « utilisation simultanée », l'administration des deux composés de la composition selon l'invention compris dans une seule et même forme pharmaceutique.

On entend par « utilisation séparée », l'administration, en même temps, des deux composés de la composition selon l'invention, compris dans des formes pharmaceutiques distinctes.

On entend par « utilisation étalée dans le temps », l'administration successive des deux composés de la composition selon l'invention, compris chacun dans une forme pharmaceutique distincte.

D'une façon générale, la composition selon l'invention augmente considérablement l'efficacité du traitement du cancer. En d'autres termes, l'effet thérapeutique de l'anticorps selon l'invention est potentialisé de manière inattendue par l'administration d'un agent cytotoxique. Un autre avantage subséquent majeur produit par une composition selon l'invention, concerne la possibilité d'utiliser des doses efficaces en principe actif plus faible, ce qui permet d'éviter ou de réduire les risques d'apparition des effets secondaires, en particulier l'effet de l'agent cytotoxique. De plus, cette composition selon l'invention permettrait d'atteindre l'effet thérapeutique escompté plus rapidement.

Par « agents thérapeutiques anti-cancer » ou « agents cytotoxiques », il faut comprendre une substance qui, lorsqu'elle est administrée à un patient, traite ou prévient le développement du cancer chez le patient. A titre d'exemple non limitatif pour de tels agents, il peut être mentionné les agents « alkylants », les antimétabolites, les antibiotiques anti-tumoraux, les inhibiteurs mitotiques, les inhibiteurs de fonction chromatine, les agents anti-angiogénèse, les anti-œstrogènes, les anti-androgènes ou les immuno-modulateurs.

De tels agents sont, par exemple, cités dans le VIDAL, à la page consacrée aux composés attachés à la cancérologie et l'hématologie colonne « Cytotoxiques », ces composés cytotoxiques cités par référence à ce document sont cités ici comme agents cytotoxiques préférés.

Les « agents alkylants » font référence à toute substance qui peut se coupler de manière covalente ou alkyler toute molécule, préférentiellement un acide nucléique (ex. : ADN), au sein d'une cellule. Comme exemples de tels agents alkylants, il peut être cité les moutardes à l'azote comme la méchloréthamine, le chlorambucil, le melphalan, le chlorhydrate, le pipobroman, la prednimustine, le phosphate disodique ou l'estramustine ; les oxazaphosphorines comme la cyclophosphamide, l'altretamine, la trofosfamide, la sulfofosfamide ou l'ifosfamide ; les aziridines ou éthylènes-imines comme le thiotepa, la triéthylèneamine ou l'altétramine ; les nitrosourées comme la carmustine, la streptozocine, la fotémustine ou la lomustine ; les sulfonates d'alkyle comme le busulfan, le tréosulfan ou l'improsulfan ; les triazènes comme la dacarbazine ; ou encore les complexes du platine comme le cisplatine, l'oxaliplatine ou le carboplatine.

Les « antimétabolites » font référence à des substances qui bloquent la croissance et/ou le métabolisme cellulaire en interférant avec certaines activités, généralement la synthèse d'ADN. A titre d'exemple d'antimétabolite, il peut être mentionné les méthotrexate, 5-fluorouracile, floxuridine, 5-fluorodeoxyuridine, capecitabine, cytarabine, fludarabine, cytosine arabinoside, 6-mercaptopurine (6-MP), 6-thioguanine (6-TG), chlorodésoxyadénosine, 5-azacytidine, gemcitabine, cladribine, deoxycoformycine et la pentostatine.

Les « antibiotiques anti-tumoraux » font référence aux composés qui peuvent prévenir ou inhiber la synthèse d'ADN, d'ARN et/ou de protéines. Des exemples de tels antibiotiques anti-tumoraux comprennent la doxorubicine, daunorubicine, idarubicine, valrubicine, mitoxantrone, dactinomycine, mithramycine, plicamycine, mitomycine C, bleomycine, et la procarbazine.

Les « inhibiteurs mitotiques » préviennent la progression normale du cycle cellulaire et de la mitose. En général, les inhibiteurs des microtubules ou « taxoïdes » comme le paclitaxel et le docétaxel sont capables d'inhiber la mitose. Les alcaloïdes de vinca, comme la vinblastine, la vincristine, la vindésine et la vinorelbine sont également capables d'inhiber la mitose.

Les « inhibiteurs de fonction chromatine » ou « inhibiteurs de topo-isomérase » font référence à des substances qui inhibent la fonction normale des protéines modélant

la chromatine comme les topo-isomérases I et II. Des exemples de tels inhibiteurs comprennent, pour la topo-isomérase I, la camptothécine ainsi que ses dérivés comme l'irinotécan ou le topotécan et, pour la topo-isomérase II, l'étoposide, le phosphate d'étoposide et le téniposide.

5 Les « agents anti-angiogénèse » font référence à toute drogue, composé, substance ou agent qui inhibe la croissance des vaisseaux sanguins. Des exemples d'agents anti-angiogénèse comprennent, sans aucune limitation, les razoxin, marimastat, batimastat, prinomastat, tanomastat, ilomastat, CGS-27023A, halofuginone, COL-3, neovastat, BMS-275291, thalidomide, CDC 501, DMXAA, L-651582, squalamine,
10 endostatine, SU5416, SU6668, interféron-alpha, EMD121974, interleukine-12, IM862, angiostatine et la vitaxine.

Les « anti-oestrogènes » ou « agents anti-oestrogéniques » font référence à toute substance qui diminue, antagonise ou inhibe l'action des oestrogènes. Des exemples de tels agents sont les tamoxifène, toremifène, raloxifène, droloxifène, iodoxyfène,
15 anastrozole, letrozole et l'exemestane.

Les « anti-androgènes » ou « agents anti-androgènes » font référence à toute substance qui réduit, antagonise ou inhibe l'action d'un androgène. Des exemples d'anti-androgènes sont les flutamide, nilutamide, bicalutamide, sprironolactone, cyproterone acétate, finasteride et la cimitidine.

20 Les immunomodulateurs sont des substances qui stimulent le système immunitaire. Des exemples de tels immunomodulateurs comprennent les interférons, les interleukines comme l'aldesleukine, OCT-43, denileukin diflitox ou l'interleukine-2, les facteurs de nécrose tumorale comme la tasonermine, ou d'autres types d'immunomodulateurs comme le lentinan, le sizofiran, le roquinimex, le pidotimod, la
25 pégadémase, la thymopentine, le poly I:C, ou le levamisole en combinaison avec le 5-fluorouracil.

Pour plus de détails, l'homme de l'art pourra se reporter au manuel édité par l'Association Française des Enseignants de Chimie Thérapeutique intitulé « traité de chimie thérapeutique, Vol. 6, Médicaments antitumoraux et perspectives dans le
30 traitement des cancers, édition TEC & DOC, 2003 ».

Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, ladite composition comme produit de combinaison selon l'invention est caractérisée en ce que ledit agent cytotoxique est couplé chimiquement audit anticorps pour une utilisation simultanée.

Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, ladite composition selon l'invention est caractérisée en ce que ledit agent cytotoxique/cytostatique est choisi parmi les agents inhibiteurs ou stabilisateurs du fuseau, de préférence la vinorelbine et/ou la vinflunine et/ou la vincristine.

Afin de faciliter le couplage entre ledit agent cytotoxique et ledit anticorps selon l'invention, on pourra notamment introduire des molécules espaceurs entre les deux composés à coupler, telles que des poly(alkylènes)glycols comme le polyéthylèneglycol, ou encore des acides aminés, ou, dans un autre mode de réalisation, utiliser des dérivés actifs desdits agents cytotoxiques dans lesquels auront été introduites des fonctions capables de réagir avec ledit anticorps selon l'invention. Ces techniques de couplage sont bien connues de l'homme de l'art et ne seront pas développées dans la présente description.

D'autres inhibiteurs de l'EGFR peuvent consister en, sans aucune limitation, les anticorps monoclonaux C225 et 22Mab anti-EGFR (ImClone Systems Incorporated), ABX-EGF (Abgenix/Cell Genesys), EMD-7200 (Merck KgaA) ou les composés ZD-1834, ZD-1838 et ZD-1839 (AstraZeneca), PKI-166 (Novartis), PKI-166/CGP-75166 (Novartis), PTK 787 (Novartis), CP 701 (Cephalon), le flunomide (Pharmacia/Sugen), CI-1033 (Warner Lambert Parke Davis), CI-1033/PD 183, 805 (Warner Lambert Parke Davis), CL-387, 785 (Wyeth-Ayerst), BBR-1611 (Boehringer Mannheim GmbH/Roche), Naamidine A (Bristol Myers Squibb), RC-3940-II (Pharmacia), BIBX-1382 (Boehringer Ingelheim), OLX-103 (Merck & Co), VRCTC-310 (Ventech Research), EGF fusion toxin (Seragen Inc.), DAB-389 (Seragen/Lilgand), ZM-252808 (Imperial Cancer Research Fund), RG-50864 (INSERM), LFM-A12 (Parker Hughes Cancer Center), WHI-P97 (Parker Hughes Cancer Center), GW-282974 (Glaxo), KT-8391 (Kyowa Hakko) ou le « EGFR Vaccine » (York Medical/Centro de Immunologia Molecular).

L'invention est, sous un autre aspect, relative à une composition caractérisée en ce que l'un, au moins, desdits anticorps, ou l'un de leur composé dérivé ou fragment fonctionnel, est conjugué avec une toxine cellulaire et/ou un radioélément.

De préférence, ladite toxine ou ledit radioélément est capable d'empêcher la croissance ou la prolifération de la cellule tumorale, notamment d'inactiver totalement ladite cellule tumorale.

De préférence encore, ladite toxine est une toxine d'entérobactéries, notamment l'exotoxine A de *Pseudomonas*.

Les radioéléments (ou radio-isotopes) préférentiellement conjugués à l'anticorps employés en thérapie sont des radio-isotopes qui émettent des rayons gamma et préférentiellement l'iode¹³¹, l'yttrium⁹⁰, l'or¹⁹⁹, le palladium¹⁰⁰, le cuivre⁶⁷, le bismuth²¹⁷ et l'antimony²¹¹. Les radio-isotopes qui émettent des rayons beta et alpha peuvent également être utilisés en thérapie.

Par toxine ou radioélément conjugué à au moins un anticorps, ou l'un de leur fragment fonctionnel, selon l'invention, on entend désigner tout moyen permettant de lier ladite toxine ou ledit radioélément audit au moins un anticorps, notamment par couplage covalent entre les deux composés, avec ou sans introduction de molécule de liaison.

Parmi les agents permettant une liaison chimique (covalente), électrostatique ou non covalente de tout ou partie des éléments du conjugué, il peut être mentionné tout particulièrement le benzoquinone, le carbodiimide et plus particulièrement l'EDC (1-éthyl-3-[3-diméthyl-aminopropyl]-carbodiimide hydrochloride), le dimaleimide, l'acide dithiobis-nitrobenzoic (DTNB), le N-succinimidyl S-acétyl thio-acétate (SATA), les agents dits de « bridging » présentant un ou plusieurs groupements, ayant un ou plusieurs groupements phényleside, réagissant avec les ultraviolets (U.V.) et tout préférentiellement le N-[4-(azidosalicylamino)butyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamide (APDP), le N-succinimid-yl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP) et le 6-hydrazino-nicotinamide (HYNIC).

Une autre forme de couplage, tout spécialement pour les radioéléments, peut consister en l'utilisation d'un chélateur d'ions bifonctionnel.

Parmi ces chélateurs, il est possible de mentionner les chélates dérivés de l'EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) ou du DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) qui ont été développés pour lier des métaux, particulièrement des métaux radioactifs, et des immunoglobulines. Ainsi, le DTPA et ses dérivés peut être substitué
5 par différents groupements sur la chaîne de carbones de manière à augmenter la stabilité et la rigidité du complexe ligand-métal (Krejcarek et al., 1977 ; Brechbiel et al., 1991 ; Gansow, 1991 ; US patent 4,831,175).

Par exemple, le DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) et ses dérivés, qui a été très largement utilisé en médecine et en biologie pendant longtemps soit sous sa
10 forme libre, soit sous la forme d'un complexe avec un ion métallique, présente la caractéristique remarquable de former des chélates stables avec des ions métalliques et d'être couplé à des protéines d'intérêt thérapeutique ou diagnostique comme des anticorps pour le développement de radio-immunoconjugués en thérapie du cancer (Meases et al., 1984 ; Gansow et al., 1990).

15 De préférence également, ledit au moins un anticorps formant ledit conjugué selon l'invention est choisi parmi ses fragments fonctionnels, notamment les fragments amputés de leur composante Fc tels que les fragments scFv.

La présente invention comprend en outre l'utilisation de la composition selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement
20 du cancer.

La présente invention est relative également à l'utilisation d'un anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, de préférence humanisé, et/ou d'une composition selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné à inhiber la prolifération de cellules tumorales. De manière générale, la présente invention a pour
25 objet l'utilisation d'un anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, de préférence humanisé, et/ou d'une composition selon l'invention, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement de cancer.

Parmi les cancers qui peuvent être prévenus et/ou traités, on préfère le cancer de la prostate, les ostéosarcomes, le cancer du poumon, le cancer du sein, le cancer de
30 l'endomètre, le cancer du côlon, le myélome multiple ou le cancer des ovaires, le cancer du pancréas ou tout autre cancer.

De manière préférée, ledit cancer est un cancer choisi parmi le cancer du sein estrogène dépendant, le cancer du poumon non à petites cellules, le cancer du côlon et/ou le cancer du pancréas.

5 Sous encore un autre aspect, la présente invention a pour objet l'utilisation de l'anticorps selon l'invention dans une méthode de diagnostic, de préférence *in vitro*, de maladies liées à un taux d'expression de JAM-A. De préférence, lesdites maladies liées à la protéine JAM-A dans ladite méthode de diagnostic seront des cancers.

Ainsi, les anticorps, ou l'un de leurs composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'invention peuvent être employés dans un procédé de détection et/ou de quantification *in vitro* de la protéine JAM-A dans un échantillon biologique, notamment pour le diagnostic de maladies associées à une expression anormale de cette protéine, telles que des cancers, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact de l'échantillon biologique avec un anticorps, ou l'un de leurs composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'invention ;
- 15 b) mise en évidence du complexe antigène-anticorps éventuellement formé.

Ainsi, la présente invention comprend également les kits ou nécessaires pour la mise en œuvre d'un procédé tel que décrit (de détection de l'expression d'un gène de *Legionella pneumophila* souche Paris, ou d'un organisme associé, ou pour la détection et/ou l'identification de bactéries appartenant à l'espèce *Legionella pneumophila* souche Paris ou un microorganisme associé), comprenant les éléments suivants :

- a) un anticorps polyclonal ou monoclonal selon l'invention ;
- b) éventuellement, les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réaction immunologique ;
- c) éventuellement, les réactifs permettant la mise en évidence des complexes antigène-anticorps produits par la réaction immunologique.

25 Les anticorps ou l'un de leurs fragments fonctionnels, selon l'invention peuvent avantageusement être immobilisés sur un support, notamment une puce à protéines. Une telle puce à protéines est un objet de l'invention.

Les puces à protéines selon l'invention peuvent être avantageusement utilisées dans des kits ou nécessaires pour la détection et/ou la quantification de la protéine JAM-A dans un échantillon biologique.

Il doit être entendu ici que le terme échantillon biologique concerne dans la présente invention les échantillons prélevés à partir d'un organisme vivant (en particulier sang, tissus, organes ou autres prélevés à partir d'un mammifère, notamment l'homme) ou tout échantillon susceptible de contenir une telle protéine JAM-A (comme un échantillon de cellules, le cas échéant transformées).

Ledit anticorps, ou l'un de ses fragments fonctionnels, peut se présenter sous forme d'immunoconjugué ou d'anticorps marqué afin d'obtenir un signal détectable et/ou quantifiable.

Les anticorps marqués selon l'invention ou leurs fragments fonctionnels incluent par exemple des anticorps dits immunoconjugués qui peuvent être conjugués par exemple avec des enzymes telles que la peroxydase, la phosphatase alcaline, l' α -D-galactosidase, la glucose oxydase, la glucose amylase, l'anhydrase carbonique, l'acétylcholinestérase, le lysozyme, la malate déhydrogénase ou la glucose-6 phosphate déhydrogénase ou par une molécule comme la biotine, la digoxigénine ou la 5-bromo-désoxyuridine. Des marqueurs fluorescents peuvent être également conjugués aux anticorps ou leurs fragments fonctionnels selon l'invention et incluent notamment la fluorescéine et ses dérivés, le fluorochrome, la rhodamine et ses dérivés, la GFP (GFP pour « Green Fluorescent Protein »), le dansyl, l'umbelliférone etc... Dans de tels conjugués, les anticorps de l'invention ou leurs fragments fonctionnels peuvent être préparés par des méthodes connues de l'homme de l'art. Ils peuvent être couplés aux enzymes ou aux marqueurs fluorescents directement ou par l'intermédiaire d'un groupe espaceur ou d'un groupe de liaisons tel qu'un polyaldéhyde, comme le glutaraldéhyde, l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), l'acide diéthylènetriaminopentaacétique (DPTA), ou en présence d'agents de couplage tels que ceux mentionnés plus haut pour les conjugués thérapeutiques. Les conjugués comportant des marqueurs de type fluorescéine peuvent être préparés par réaction avec un isothiocyanate.

D'autres conjugués peuvent inclure également des marqueurs chimioluminescents tels que le luminol et les dioxétanes, des marqueurs bioluminescents tels que la luciférase et la luciférine, ou encore des marqueurs radioactifs tels que l'iode¹²³, l'iode¹²⁵, l'iode¹²⁶, l'iode¹³³, le brome⁷⁷, le technetium^{99m}, l'indium¹¹¹, l'indium^{113m}, le gallium⁶⁷, le gallium⁶⁸, le ruthenium⁹⁵, le

ruthenium⁹⁷, le ruthenium¹⁰³, le ruthenium¹⁰⁵, le mercure¹⁰⁷, le mercure²⁰³, le rhenium^{99m}, le rhenium¹⁰¹, le rhenium¹⁰⁵, le scandium⁴⁷, le tellurium^{121m}, le tellurium^{122m}, le tellurium^{125m}, le thulium¹⁶⁵, le thulium¹⁶⁷, le thulium¹⁶⁸, la fluorine¹⁸, l'yttrium¹⁹⁹, l'iode¹³¹. Les procédés connus de l'homme de l'art existant pour coupler
5 les radio-isotopes aux anticorps, soit directement, soit via un agent chélateur comme l'EDTA ou le DTPA mentionné plus haut, peuvent être utilisés pour les radioéléments en diagnostic. Il est donc également possible de mentionner le marquage au [¹²⁵I]Na par la technique de la chloramine T [Hunter W.M. and Greenwood F.C. (1962) Nature 194:495] ou également avec le technetium^{99m} par la technique de Crockford *et al.* (US
10 patent 4,424,200) ou fixé via le DTPA comme décrit par Hnatowich (US patent 4,479,930).

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un anticorps selon l'invention, pour la préparation d'un médicament destiné au ciblage spécifique d'un composé biologiquement actif vers des cellules exprimant ou surexprimant la protéine JAM-A.

15 On entend désigner ici par composé biologiquement actif tout composé capable de moduler, notamment d'inhiber, l'activité cellulaire, en particulier leur croissance, leur prolifération, la transcription ou la traduction de gène.

L'invention a aussi pour objet un réactif de diagnostic *in vivo* comprenant un anticorps selon l'invention, ou l'un de ses fragments fonctionnels, de préférence
20 marqué, notamment radiomarké, et son utilisation en imagerie médicale, en particulier pour la détection de cancer lié à l'expression ou à la surexpression par une cellule de la protéine JAM-A.

L'invention est également relative à une composition comme produit de combinaison ou à un conjugué anti-JAM-A/toxine ou radioélément, selon l'invention, à
25 titre de médicament.

De préférence, ladite composition comme produit de combinaison ou ledit conjugué selon l'invention sera additionné d'un excipient et/ou d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Dans la présente description, on entend désigner par véhicule
30 pharmaceutiquement acceptable, un composé ou une combinaison de composés entrant dans une composition pharmaceutique ne provoquant pas de réactions secondaires et qui

permet par exemple la facilitation de l'administration du ou des composés actifs, l'augmentation de sa durée de vie et/ou de son efficacité dans l'organisme, l'augmentation de sa solubilité en solution ou encore l'amélioration de sa conservation. Ces véhicules pharmaceutiquement acceptables sont bien connus et seront adaptés par l'homme de l'art en fonction de la nature et du mode d'administration du ou des composés actifs choisis.

De préférence, ces composés seront administrés par voie systémique, en particulier par voie intraveineuse, par voie intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale ou sous-cutanée, ou par voie orale. De manière plus préférée, la composition comprenant les anticorps selon l'invention, sera administrée à plusieurs reprises, de manière étalée dans le temps.

Leurs modes d'administration, posologies et formes galéniques optimaux peuvent être déterminés selon les critères généralement pris en compte dans l'établissement d'un traitement adapté à un patient comme par exemple l'âge ou le poids corporel du patient, la gravité de son état général, la tolérance au traitement et les effets secondaires constatés.

L'invention concerne donc l'utilisation d'un anticorps, ou l'un de ses fragments fonctionnels pour la préparation d'un médicament destiné au ciblage spécifique d'un composé biologiquement actif vers des cellules exprimant ou surexprimant JAM-A.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description avec les exemples et les figures dont les légendes sont représentées ci-après.

LEGENDES DES FIGURES

Lexique de traduction :

« Domain » pour domaine ; « name » pour nomenclature ; « Sequential numbering » pour numérotation séquentielle ; « IMGT unique numbering » pour numérotation unique IMGT ; « Kabat VH numbering » pour numérotation VH de Kabat.

La figure 1 montre les séquences respectives des chaînes lourdes et légères de l'anticorps 6F4 selon l'invention. Les CDRs apparaissent soulignés et en gras.

Les figures 2A et 2B représentent les alignements respectifs des régions V (figure 2A) et J (figure 2B) de l'anticorps murin 6F4 et des germlines murines retenues, à savoir IGKV19-93*01 (SEQ ID No. 21) pour la région V et IGKJ1*01 (SEQ ID No. 22) pour la région J.

5 Les figures 3A et 3B représentent les alignements respectifs des régions V (figure 3A) et J (figure 3B) de l'anticorps murin 6F4 et des germlines humaines retenues, à savoir IGKV1-33*01 (SEQ ID No. 23) pour la région V et IGKJ1*01 (SEQ ID No. 24) pour la région J.

La figure 4 représente la séquence protéique de la chaîne légère de l'anticorps 10 6F4 avec mise en évidence des numérotations respectives de KABAT et IMGT.

Les figures 5A, 5B et 5C représentent les alignements respectifs des régions V (figure 5A), D (figure 5B) et J (figure 5C) de l'anticorps murin 6F4 et des germlines murines retenues, à savoir IGHV1S135*01 (SEQ ID No. 25) pour la région V, IgHD-ST4*01 (SEQ ID No. 26) pour la région D et IgHJ2*01 (SEQ ID No. 27) pour la région 15 J.

Les figures 6A, 6B et 6C représentent les alignements respectifs des régions V (figure 6A), D (figure 6B) et J (figure 6C) de l'anticorps murin 6F4 et des germlines humaines retenues, à savoir IGHV1-f*01 (SEQ ID No. 28) pour la région V, IGHD1-1*01 (SEQ ID No. 29) pour la région D et IGHJ4*01 (SEQ ID No. 30) pour la région J.

20 La figure 7 représente la séquence protéique de la chaîne lourde de l'anticorps 6F4 avec mise en évidence des numérotations respectives de KABAT et IMGT.

Les figures 8A et 8B représentent une immunopurification sur support 6F4-Sépharose de l'antigène du 6F4 à partir de membranes de cellules HT-29. Analyses des fractions collectées par électrophorèse SDS-PAGE (figure 8A) et western blot (figure 25 8B).

Les figures 9A et 9B montrent une analyse par électrophorèse SDS-PAGE (figure 9A) et western blot (figure 9B) de la protéine immunopurifiée. Deux purifications (#1 et #2) ont été réalisées et analysées en conditions réductrices et non réductrices.

30 La figure 10 montre une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF du mélange de peptides extraits après hydrolyse trypsique.

Les figures 11A et 11B consistent en une confirmation de la protéine identifiée par western blot (conditions non réductrices) : révélation à l'aide de l'anticorps 6F4 (figure 11A) et d'un anticorps polyclonal anti-human JAM-A (figure 11B).

La figure 12 montre la spécificité de l'anticorps 6F4 pour la protéine JAM-A humaine. Les quantités déposées pour chaque protéine sont 250, 25 et 10 ng.

La figure 13 représente les Sensorgrams obtenus après 2 minutes d'injection (double flèche) de l'anticorps 6F4 à 100 nm en tampon HBS-EP sur la protéine JAM1 Fc murin (Flow cell # 1, graphe du bas) et de la protéine JAM1 Fc murin (Flow cell # 2, graphe du haut) avec un délai de dissociation à 25°C de 5 minutes et un débit de 30 µl/min (CM4 : m-JAM1-Fc 501.6 RU (Fc1) et 511.5 RU (Fc2)).

La figure 14 représente les Sensorgrams obtenus avec une double référence (Fc2-Fc1)6F4-(Fc2-Fc1)HBS-EP. Le fitting est obtenu en utilisant un modèle de liaison de Langmuir A+B. Les paramètres cinétiques calculés (courbes noires) sont les suivants : $k_a = (1,38 \pm 0,001) * 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_d = (0,25 \pm 1,58) * 10^{-6} \text{ s}^{-1}$; R_{max} (global fitting) = 371 RU ; $\kappa^2 = 0,853$.

La figure 15 illustre l'activité antitumorale de l'anticorps 6F4 dans un modèle de xenogreffe des cellules MCF-7 chez la souris Swiss nude. L'anticorps 6F4 a été testé par voie i.p., sous forme non purifiée (liquide d'ascite), à la dose théorique de 250 µg/souris, 2 fois par semaine. L'anticorps 9G4 est un anticorps de même isotype (IgG1) irrelevant par rapport à l'activité mesurée.

La figure 16 illustre l'expression de la protéine JAM-A reconnue par le Mab 6F4 à la surface de différentes lignées tumorales.

EXEMPLES

Exemple 1 : Génération de l'anticorps 6F4

Pour générer l'anticorps monoclonal murin (Mab), des souris BALB/c ont été immunisées à l'aide de $5 \cdot 10^6$ cellules MCF-7 en provenance de l'ATCC. Après une injection de rappel finale de 10^7 cellules MCF-7, les ganglions de deux souris sont fusionnés à des cellules de myélome Sp 2/O-Ag 14 par les techniques classiquement décrites par Kohler et Milstein. Les surnageants des hybridomes résultant de la fusion

ont ensuite été criblés sur une activité fonctionnelle : l'inhibition de la prolifération des cellules MCF-7 *in vitro*.

Pour ce crible, les cellules MCF-7 sont ensemencées dans des plaques de culture 96 puits à raison de $5 \cdot 10^3$ cellules/puits dans 100 μl de milieu hybridome sans sérum de veau fœtal. Les plaques sont incubées pendant 24 heures à 37°C en atmosphère 5 % CO₂. Après 24 heures, 50 μl de surnageant des hybridomes à cribler sont additionnés à chaque puits. La dernière ligne de la plaque est réservée au positionnement des contrôles :

- 3 puits sont additionnés de 50 μl d'un surnageant d'hybridome non relevant par rapport à l'activité recherchée et cultivé dans le même milieu de culture que celui utilisé pour les plaques fusionnées. Ces puits serviront à calibrer l'impact d'un surnageant inactif sur l'incorporation de thymidine tritiée.
- 3 puits recevront 50 μl de milieu de culture des hybridomes.

Après environ 52 heures de culture, chaque puits est additionné de 0,25 μCi de [³H]thymidine et à nouveau incubé durant 20 heures à 37°C. L'incorporation de la [³H]thymidine dans le DNA, signant la prolifération cellulaire, est quantifiée par la mesure de la scintillation liquide. Un bruit de fond et des seuils sont déterminés pour chaque plaque en fonction des puits témoins contenant le milieu seul et le surnageant d'hybridome irrelevant.

Par cette méthode 43 hybridomes sécrétant des anticorps inhibant la prolifération des cellules MCF-7 ont été retenus à l'issue d'un premier criblage. Onze de ces 43 hybridomes avaient une croissance trop faible voire nulle et ont été abandonnés. Lors des tests de prolifération effectués suite à l'expansion et au clonage des hybridomes seuls les hybridomes dont le surnageant avait une activité inhibitrice ≥ 20 % sur la prolifération des cellules MCF-7 ont été conservés. En fin de processus de Clonage/sélection, seul 1 clone s'est avéré avoir les propriétés requises. Il s'agit du clone 6F4.

Exemple 2 : Processus d'humanisation par CDR-grafting de la région variable de la chaîne légère de l'anticorps 6F4 (6F4 VL)

a) *Comparaison de la séquence en nucléotides de 6F4 VL avec toutes les séquences de Germlines murines connues*

Comme étape préliminaire à l'humanisation par CDR-grafting, la séquence en nucléotides de 6F4 VL a été comparée dans un premier temps à toutes les séquences de Germlines murines présentes dans la banque de données de IMGT (adresse Internet : <http://imgt.cines.fr>).

5 Des régions V et J de Germlines de souris ayant une identité de séquences de 98,56 % pour la région V et 100 % pour la région J ont été identifiées, respectivement IGKV19-93*01 (SEQ ID No. 21, Nomenclature EMBL : AJ235935) et IGKJ1*01 (SEQ ID No. 22, Nomenclature EMBL : V00777).

Compte tenu de ces pourcentages d'identité, il a été choisi d'utiliser directement
10 la séquence de 6F4 VL.

Ces alignements sont représentés à la figure 2A pour la région V et à la figure 2B pour la région J.

b) *Comparaison de la séquence en nucléotides de 6F4 VL avec toutes les séquences de Germlines humaines connues*

15 Afin d'identifier le meilleur candidat humain pour le CDR-grafting on a recherché la Germline d'origine humaine ayant la plus grande identité possible avec 6F4 VL. A cette fin, on a comparé la séquence en nucléotides de 6F4 VL de souris avec toutes les séquences de Germlines humaines présentes dans la base de données de IMGT.

20 Des régions V et J de Germlines d'origine humaine ont été identifiées avec une identité de séquences de 81,36 % pour la région V, à savoir IGKV1-33*01 (SEQ ID No. 23, Nomenclature EMBL : M64856) et de 86,84 % pour la région J, à savoir IGKJ1*01 (SEQ ID No. 24, Nomenclature EMBL : J00242).

Les Germlines IGKV1-33*01 pour la région V et IGKJ1*01 pour la région J ont
25 donc été choisies comme séquences humaines receveuses des CDRs de 6F4 VL de souris.

Ces alignements sont repris à la figure 3A pour la région V et à la figure 3B pour la région J.

c) *Versions humanisées de 6F4 VL*

L'étape suivante dans le procédé d'humanisation consistera à joindre entre elles les séquences des Germlines IGKV1-33*01 et IGKJ1*01 puis à joindre les CDRs de 6F4 VL de souris aux régions charpentes (Rch) de ces mêmes Germlines.

A ce stade du procédé le modèle moléculaire des régions Fv de souris de 6F4 sera particulièrement utile dans le choix des résidus de souris à conserver car pouvant jouer un rôle soit dans le maintien de la structure tridimensionnelle de la molécule (structure canonique des CDRs, interface VH/VL, etc.) ou dans la liaison à l'antigène. Dans les Rch, chaque différence entre les nucléotides de souris (6F4 VL) et humain (IGKV1-33*01 / IGKJ1*01) sera examinée scrupuleusement.

Pour plus de clarté par la suite, il est représenté à la figure 4 la séquence de 6F4VL avec mise en évidence des numérotations de KABAT et IMGT.

Ont été identifiés trois résidus murins qui seront impérativement conservés.

Le résidu 33 (Ile) participe à l'ancrage du CDR1 selon IMGT et fait partie du CDR1 selon Kabat.

Le résidu 49 (His) participe à l'ancrage du CDR2 selon IMGT, participe à l'interface VH / VL et appartient à la zone Vernier.

Le résidu 53 (Thr) participe à l'ancrage du CDR2 selon IMGT et appartient au CDR2 selon Kabat.

Dans un premier temps, trois changements dans les régions charpentes (Rch) de IGKV1-33*01 et IGKJ1*01 seront étudiés. Ces changements concernent les résidus 24, 69 et 71 (nomenclature IMGT). Il faut comprendre, bien entendu, que ces trois changements seront étudiés indépendamment les uns des autres et également selon diverses combinaisons. Le but est de disposer de tous les mutants possibles afin de pouvoir les tester et conserver le mutant ayant conservé les meilleures propriétés de liaison. Des tests de liaison type ELISA/Biacore seront donc réalisés sur chacun des mutants.

Le résidu 24 (Lys / Gln) est proche du CDR1 et pourrait de ce fait être critique pour le maintien d'une conformation permettant une présentation correcte du CDR1. Plus particulièrement, ce résidu risque d'interagir avec les résidus 69-70 au sein de la zone Vernier. La Lys est très faiblement représentée dans les VL humaines mais appartient au CDR1 selon Kabat.

Bien que le résidu 69 (Arg / Thr) appartienne à la zone Vernier et participe donc directement à la structure canonique du CDR1, ce résidu est toujours une Thr dans les VL humaines.

Bien que le résidu 71 (Tyr / Phe) participe directement à la structure canonique du CDR1, il est systématiquement une Phe dans les VL humaines.

Dans un deuxième temps, il peut être envisagé une modification du résidu 56 (Ala) en Thr. Ce résidu, bien qu'en dehors des CDRs selon IMGT appartient au CDR2 selon Kabat.

Enfin, dans un troisième temps, deux changements supplémentaires pourront être réalisés au niveau des résidus 34 et 55 (nomenclature IMGT). Ces deux résidus, en dehors des CDRs définis par IMGT sont compris dans les CDRs tels que définis par Kabat.

Le résidu 34 (Ala / Asn) appartient au CDR1 selon Kabat et participe à l'interface VH / VL. Une telle mutation reste relevante malgré la forte représentation de Ala chez l'homme.

Le résidu 55 (Gln / Glu) appartient au CDR2 selon Kabat et participe également à l'interface VH / VL. Une telle mutation reste également relevante malgré la forte représentation de Gln chez l'homme.

De même que ce qui est décrit plus haut, ces trois mutations pourront être testées indépendamment ou selon diverses combinaisons.

Exemple 3 : Processus d'humanisation par CDR-grafting de la région variable de la chaîne lourde de l'anticorps 6F4 (6F4 VH)

a) *Comparaison de la séquence en nucléotides de 6F4 VH avec toutes les séquences de Germlines murines connues*

Comme étape préliminaire à l'humanisation par CDR-grafting, la séquence en nucléotides de 6F4 VH a été comparée dans un premier temps à toutes les séquences de Germlines de souris présentes dans la banque de données de IMGT (adresse Internet : <http://imgt.cines.fr>).

Des régions V, D et J de Germlines murines avec une identité de séquences de 99,30 % pour la région V, à savoir IGHVIS135*01 SEQ ID No. 25, Nomenclature EMBL : AF304556), de 80 % pour la région D, à savoir IgHD-ST4*01 (SEQ ID No. 26,

Nomenclature EMBL : M23243) et de 100 % pour la région J, à savoir IgHJ2*01 (SEQ ID No. 27, Nomenclature EMBL : V00770).

Ces alignements sont représentés à la figure 5A pour la région V, la figure 5B pour la région D et la figure 5C pour la région J.

5 Compte tenu de ces pourcentages d'identité, il a été choisi d'utiliser directement les séquences de 6F4 VH, comme cela a également été le cas pour 6F4 VL.

b) *Comparaison de la séquence en nucléotides de 6F4 VH avec toutes les séquences de Germlines humaines connues*

Afin d'identifier le meilleur candidat humain pour le « CDR-grafting », on a
10 recherché les Germlines d'origine humaine ayant la plus grande identité possible avec chacune des trois régions V, D et J de 6F4 VH. A cette fin on a comparé la séquence en nucléotides de 6F4 VH de souris avec toutes les séquences de Germlines humaines présentes dans la base de données de IMGT.

Des Germlines d'origine humaine ont été identifiées ayant une identité de
15 séquences de 75,34 % pour la région V, à savoir IGHV1-f*01 (SEQ ID No. 28, Nomenclature EMBL : Z12305), 71,42 % pour la région D, à savoir IGHD1-1*01 (SEQ ID No. 29, Nomenclature EMBL : X97051) et de 87,51 % pour la région J, à savoir IGHJ4*01 (SEQ ID No. 30, Nomenclature EMBL : J00256).

Pour chacune des régions V, D et J, les lignées germinales ci-dessus ont été
20 choisies et réarrangées entre elles.

Ces alignements sont repris en figure 6A pour la région V, figure 6B pour la région D et figure 6C pour la région J.

c) *Versions humanisées de 6F4 VH*

L'étape suivante dans le procédé d'humanisation consistera à joindre entre elles
25 les séquences des Germlines IGHV1-f*01, IGHD1-1*01 et IGHJ4*01 puis à joindre les CDRs de 6F4 VH de souris aux régions charpentes (Rch) de ces mêmes Germlines.

A ce stade du procédé le modèle moléculaire des régions Fv de souris de 6F4 sera particulièrement utile dans le choix des résidus de souris à conserver car pouvant
30 jouer un rôle soit dans le maintien de la structure tridimensionnelle de la molécule (structure canonique des CDRs, interface VH/VL, etc.) ou dans la liaison à l'antigène.

Dans les Rch, chaque différence entre les nucléotides de souris (6F4 VH) et humain (IGHV1-f*01, IGHD1-1*01 et IGHJ4*01) sera examinée scrupuleusement.

Pour plus de clarté par la suite, il est représenté à la figure 7 la séquence de 6F4VH avec mise en évidence des numérotations de KABAT et IMGT.

5 De manière similaire à la chaîne légère, quatre résidus devant rester inchangés ont été identifiés.

Le résidu 2 (Ile) appartient à la zone Vernier, participe à la structuration du CDR3.

10 Le résidu 35 (Tyr) participe à l'ancrage du CDR1 selon IMGT, appartient au CDR1 selon Kabat, participe également à l'interface VH/VL et interagit avec le CDR3.

Le résidu 50 (Tyr) participe à l'ancrage du CDR2 selon IMGT, appartient au CDR2 selon Kabat, appartient également à la zone Vernier et participe également à l'interface VH/VL.

15 Le résidu 59 (Arg) participe à l'ancrage du CDR2 selon IMGT, appartient au CDR2 selon Kabat et participe à l'interface VH/VL.

Une première version humanisée pourra comprendre trois mutations, respectivement des résidus 61, 62 et 65 (numérotation IMGT).

Ces trois résidus sont situés dans le CDR 2 selon Kabat et participent à l'interface VH/VL.

20 Le résidu 61 (Asn / Ala) n'est pas directement impliqué dans la reconnaissance de l'antigène. Sa mutation peut donc être envisagée.

Résidu 62 : Gln / Glu et résidu 65 Lys / Gln.

Dans un deuxième temps, deux changements supplémentaires seront évalués. Ces deux changements concernent les résidus 48 et 74 (Nomenclature IMGT).

25 Le résidu 48 (Ile / Met), faisant partie de la région charpente, participe à l'interface VH/VL.

Le résidu 74 (Lys / Thr) appartient à la zone Vernier et risque d'être impliqué dans la structuration du CDR2.

30 Enfin, dans un troisième temps, il pourra être envisagé une troisième série de mutations, à savoir un changement des résidus 9 (Pro / Ala) et 41 (His / Pro). Le but est donc, de manière similaire aux mutations prévues pour 6F4 VL, de se rapprocher le plus

possible de la Germline humaine sans entraîner de modification au niveau de l'ancrage des CDRs.

A titre récapitulatif, les tableaux 4 et 5 ci-dessous regroupent les germlines utilisées ainsi que, respectivement, leur numéro de séquence en acides-aminés et en nucléotides.

Tableau 4

GERMLINES	SEQ ID No.
IGKV19-93*01 (AJ235935)	21
IGKJ1*01 (V00777)	22
IGKV1-33*01 (M64856)	23
IGKJ1*01 (J00242)	24
IGHV1S135*01 (AF304556)	25
IGHD-ST4*01 (M23243)	26
IGHJ2*01 (V00770)	27
IGHV1-f*01 (Z12305)	28
IGHD1-1*01 (X97051)	29
IGHJ4*01 (J00256)	30

Tableau 5

GERMLINES	SEQ ID No.
IGKV19-93*01 (AJ235935)	31
IGKJ1*01 (V00777)	32
IGKV1-33*01 (M64856)	33
IGKJ1*01 (J00242)	34
IGHV1S135*01 (AF304556)	35
IGHD-ST4*01 (M23243)	36
IGHJ2*01 (V00770)	37
IGHV1-f*01 (Z12305)	38
IGHD1-1*01 (X97051)	39
IGHJ4*01 (J00256)	40

10 **Exemple 4 : Purification et identification de l'antigène cible de l'anticorps**
6F4

Purification par immunoaffinité

L'antigène cible de l'anticorps 6F4 est purifié à partir d'une fraction membranaire enrichie de cellules HT-29. Après solubilisation dans un tampon 50 mM
 15 Tris/HCl pH 7,4 contenant 150 mM NaCl, du Triton X-100 et de l'IGEPAL, les protéines membranaires sont incubées en présence de l'anticorps 6F4 immobilisé sur

des billes de Sepharose pendant une nuit à +4°C sous agitation douce. Le complexe 6F4-Ag formé sur les billes est ensuite lavé par différentes solutions comportant des détergents afin d'éliminer les protéines adsorbées de manière non spécifique. L'antigène cible du 6F4 est élué du support 6F4-Sepharose à l'aide d'un tampon 0,1 M Gly/HCl pH 2,7. Les fractions collectées sont analysées par électrophorèse SDS-PAGE (gel 10 %, conditions non réductrices) et western blot après transfert sur membrane de nitrocellulose (anticorps primaire 6F4 utilisé à 0,5 µg/ml, détection par chimioluminescence) afin de sélectionner les fractions enrichies en antigène d'intérêt (figures 8A et 8B). L'analyse par western blot confirme l'absence de la protéine d'intérêt dans les fractions non retenues et les lavages, et une élution spécifique de cette dernière à pH acide.

Les fractions enrichies issues de 2 purifications ont ensuite été analysées par électrophorèse SDS-PAGE (gel 10 %) et western blot dans les conditions décrites précédemment. L'antigène reconnu par l'anticorps 6F4 en western blot présente une masse moléculaire apparente de 35 kDa après analyse en conditions réductrices (figures 9A et 9B). On constate une différence de masse moléculaire apparente lorsque l'électrophorèse est réalisée en conditions non réductrices : dans ces conditions, la masse moléculaire apparente est en effet légèrement inférieure à celle observée en conditions réductrices.

20 Identification de l'antigène cible

Après électrophorèse SDS-PAGE (gel 10 %), les protéines sont colorées au bleu colloïdal à l'aide d'une méthode compatible avec l'analyse par spectrométrie de masse (figure 10). La bande d'intérêt correspondant à la protéine détectée par western blot est découpée à l'aide d'un scalpel puis décolorée par incubation dans une solution de bicarbonate d'ammonium 25 mM. Après réduction (DTT) / alkylation (iodoacétamide) puis hydrolyse « in gel » (pendant 1 nuit à 37°C) de la protéine par la trypsine (Promega), enzyme protéolytique qui hydrolyse les protéines au niveau des résidus Lysine et Arginine et libère donc des peptides possédant un résidu Lysine ou Arginine en position C-terminale, les peptides générés sont extraits à l'aide d'un mélange acétonitrile/eau (70/30, v/v) en présence d'acide formique. Ceux-ci sont ensuite déposés sur cible MALDI en mélange avec une matrice (alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid,

Bruker Daltonics) et en présence d'ATFA, puis analysés par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Autoflex, Bruker Daltonics). Le spectre de masse obtenu est présenté en figure 10. La liste des peptides déduite de cette analyse est utilisée pour identifier la protéine par recherche dans les banques de données à l'aide du moteur de recherche Mascot (Matrix Sciences).

Le résultat de la recherche dans la banque de données NCBIInr, avec restriction aux protéines d'origine humaine, indique que 3 protéines présentent un score significatif (score > 64) :

1. Crystal structure of human junctional adhesion molecule type 1

Score = 116

Cette protéine correspond au domaine extracellulaire de la protéine F11R/JAM-A utilisé pour des études structurales.

2. F11 receptor (Homo sapiens)

Score = 116

Cette protéine correspond au précurseur de la protéine F11R/isoforme a.

3. F11 receptor isoform b (Homo sapiens)

Score = 65

Il s'agit du précurseur de l'isoforme b de la protéine F11R, présentant 2 délétions de 20 acides aminés par rapport à l'isoforme a.

La protéine identifiée, par cette approche, est donc appelée F11R ou « F11 receptor ». Il s'agit en fait de la dénomination officielle de la protéine adoptée lors de la première description de celle-ci comme récepteur d'un anticorps appelé F11 (Naik *et al.*, 1995, *Biochem. J.* 310, 155-162). Cette protéine est aujourd'hui plus connue sous le nom de JAM-A ou « junctional adhesion molecule A », et porte aussi le nom de JAM1, PAM-1, CD321 ou antigène 106.

Parmi les peptides libérés par hydrolyse trypsique et analysés par spectrométrie de masse, 9 peptides présentent une masse moléculaire expérimentale correspondant, à moins de 0,1 Da près, à celle de peptides issus de l'hydrolyse théorique de la forme humaine de JAM-A/isoforme a. Ces 9 peptides permettent de couvrir 37 % de la séquence primaire de la protéine. De plus, la masse moléculaire théorique du précurseur

de JAM-A (~ 32,9kDa) est en accord avec la masse moléculaire apparente déterminée expérimentalement par SDS-PAGE.

Confirmation de la cible identifiée par western blot

L'identification de JAM-A par approche protéomique a ensuite été confirmée par western blot (gel SDS-PAGE 10 % en conditions non réductrices, anticorps 6F4 à 0,5 µg/ml, détection ECL).

Comme le montre la figure 11A, l'anticorps 6F4 reconnaît la protéine JAM-A naturelle dans l'extrait membranaire de HT-29 et la fraction enrichie par immunopurification (MM apparente = 35kDa), ainsi que la protéine recombinante dimérique JAM-A/Fc (R&D Systems réf. 1103-JM, MM apparente ~120kDa). Cette reconnaissance est équivalente à celle d'un anticorps polyclonal de chèvre anti-humain JAM-A commercial (R&D Systems, réf. AF1103) utilisé au 1/1000^{ème} (figure 11B).

Exemple 5 : Spécificité de l'anticorps 6F4 pour JAM-A humain

La spécificité de l'anticorps 6F4 a été déterminée par western blot dans les conditions décrites précédemment.

La figure 12 montre que l'anticorps 6F4 est spécifique de la forme humaine de JAM-A puisqu'il reconnaît la protéine recombinante hJAM-A/Fc (R&D Systems réf. 1103-JM), mais ne reconnaît ni les formes humaines de JAM-B et JAM-C (protéines recombinantes hJAM-B/Fc et hJAM-C/Fc, R&D Systems réf. 1074-VJ et 1189-J3), ni la forme murine de JAM-A (protéine recombinante mJAM-A/Fc, R&D Systems réf. 1077-JM).

Exemple 6 : Mesure de l'affinité de l'anticorps 6F4 par BIAcore (Surface Plasmon Resonance)

Principe

Par BIAcore, la constante d'affinité K_D (M) de l'anticorps 6F4 pour la protéine JAM-1-Fc soluble (domaine extra-cellulaire fusionné à un fragment Fc d'anticorps et produit sous forme recombinée dans des cellules NS0), peut être calculée à partir de la détermination des paramètres cinétiques de l'association k_a (1/M.s) et de la dissociation k_d (1/s) d'après la formule $K_D = k_d/k_a$ (Rich et Myszka, J. Mol. Recog., 2005, 18, 431).

Matériels et méthodes

Instrument utilisé : BIAcore X et logiciel BIAevaluation 3.1 X (Uppsala, SW)

Réactifs :

- Anticorps monoclonal murin 6F4 : 1,3mg/ml
- Human JAM-1-Fc (ref 1103-JM R&D Systems) : 50 µg sans composé porteur (“carrier free”)
- 5 - Mouse JAM-1-Fc (ref 1077-JM R&D Systems) : 50 µg “carrier free”
- Tampon de course: HBS-EP (BIAcore)
- Kit de couplage: “Amine” (BIAcore)
- Tampon de couplage: Acétate pH 5,0 (BIAcore)
- Anticorps de capture : anti-humain de chèvre IgG Fc (= GAH, goat anti-human)
- 10 (Bioscience)
- Tampon de régénération : Glycine, HCl pH 1,5 pendant 30 secondes (BIAcore).

Discussions et Conclusions

Les données de la figure 13 montrent que l’anticorps murin 6F4 se lie à la partie extracellulaire de la protéine JAM-1 humaine mais pas à la partie extracellulaire de la protéine JAM-1 murine.

Les données de la figure 14 permettent de calculer un K_D de 22 pM de l’anticorps 6F4 pour la protéine JAM-1 humaine dans ces conditions expérimentales.

La lente cinétique de dissociation indique qu’il s’agit d’un phénomène d’avidité de l’anticorps pour l’antigène (modèle de l’analytique divalent).

20 **Exemple 7 : Activité *in vivo* de l’anticorps 6F4 dans le modèle de xénogreffe MCF-7**

Un test de l’anticorps 6F4 non purifié et injecté par voie i.p. à la dose de 250 µg/souris montre que cet anticorps inhibe significativement la croissance des cellules MCF-7 *in vivo* avec des pourcentages d’inhibition atteignant 56 % par rapport aux souris injectées avec du PBS (figure 15). L’anticorps non relevant 9G4 utilisé

25 comme isotype contrôle IgG1 est comme attendu sans aucune activité anti-tumorale.

Exemple 8 : Etude de la distribution de l’antigène reconnu par le 6F4 sur un panel de cellules tumorales

Afin de déterminer les indications potentielles de l’anticorps 6F4, quatre types

30 tumoraux ont été étudiés par cytométrie en flux en terme de profil d’expression membranaire. Les lignées cellulaires sélectionnées sont MCF-7 (cancer du sein

estrogène dépendant), A549 (cancer du poumon non à petites cellules), HT29 et Colo 205 (cancer du côlon) et BxPC3 (cancer du pancréas). Pour le marquage des cellules, une gamme de dose de 10 ; 5 ; 1 ; 0,5 ; 0,25 ; 0,125 $\mu\text{g/ml}$ a été testée.

5 Les résultats présentés à la figure 16 montrent que l'anticorps 6F4 reconnaît un antigène significativement exprimé à la surface de toutes les cellules testées. Le marquage obtenu est saturable ce qui atteste de sa spécificité. La saturation des sites est obtenue dès la concentration de 1 $\mu\text{g/ml}$ d'anticorps ce qui laisse penser que l'affinité de l'anticorps 6F4 pour l'antigène JAM-A est importante.

REVENDICATIONS

1. Anticorps isolé, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels capable d'inhiber la prolifération de cellules tumorales *in vitro* et/ou *in vivo*, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un CDR choisi parmi les CDRs de séquence SEQ ID No. 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 ou au moins un CDR dont la séquence présente au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec les séquences SEQ ID No. 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.
2. Anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste en un anticorps monoclonal.
3. Anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend une chaîne lourde comprenant au moins un des trois CDRs de séquence SEQ ID Nos. 2, 4 et 6, ou au moins une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec les séquences SEQ ID Nos. 2, 4 ou 6.
4. Anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend une chaîne lourde comprenant les trois CDRs suivants :
- la séquence SEQ ID No. 2 ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 2 ;
 - la séquence SEQ ID No. 4 ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 4 ; et
 - la séquence SEQ ID No. 6 ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 6.
5. Anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend une chaîne légère comprenant au moins un des trois CDRs de séquence SEQ ID Nos. 1, 3 et 5, ou présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec les séquences SEQ ID Nos. 1, 3 et 5.
6. Anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend une chaîne légère comprenant les trois CDRs suivants :

- le CDR de séquence SEQ ID No. 1 ou de séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 1 ;
- le CDR séquence SEQ ID No. 3 ou de séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 3 ; et
- 5 - la séquence SEQ ID No. 5 ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 5.

7. Anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend une chaîne légère comprenant les trois CDRs suivants :

- 10 - le CDR de séquence SEQ ID No. 1 ou de séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 1 ;
- le CDR séquence SEQ ID No. 3 ou de séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 3 ; et
- la séquence SEQ ID No. 5 ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 5, et
- 15 une chaîne lourde comprenant les trois CDRs suivants :
 - la séquence SEQ ID No. 2 ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 2 ;
 - la séquence SEQ ID No. 4 ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 4 ; et
 - 20 - la séquence SEQ ID No. 6 ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 6.

8. Anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend

25 une chaîne légère de séquence comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 7 ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 7, et en ce qu'il comprend une chaîne lourde de séquence comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 8 ou une présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 8.

30 9. Anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit

composé dérivé consiste en une protéine de liaison comprenant une charpente peptidique sur laquelle est greffé au moins un CDR de manière à conserver tout ou partie des propriétés paratopiques de reconnaissance de l'anticorps initial.

10 10. Anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon la revendication 9, caractérisé en ce que la charpente peptidique est sélectionnée parmi les protéines a) phylogénétiquement bien conservée, b) d'architecture robuste, c) avec une organisation moléculaire en trois dimensions bien connues, d) de petite taille et/ou e) comprenant des régions pouvant être modifiées par délétion et/ou insertion sans modifications des propriétés de stabilité.

10 11. Anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon la revendication 9 ou 10 caractérisé en ce que ladite charpente peptidique est sélectionnée parmi i) les charpentes issues de la fibronectine, préférentiellement le 10ème domaine de la fibronectine de type 3, la lipocaline, l'anticaline, la protéine Z issue du domaine B de la protéine A de *Staphylococcus aureus*, la thioredoxin A, ii) les
15 protéines à motifs répétés de type « ankyrin repeat », « armadillo repeat », « leucine-rich repeat » ou « tetratricopeptide repeat », ou encore iii) les inhibiteurs protéiques de la NO synthase neuronale (PIN).

 12. Anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit
20 fragment fonctionnel est choisi parmi les fragments Fv, Fab, (Fab')₂, Fab', scFv, scFv-Fc et les diabodies, ou tout fragment dont la demie-vie aurait été augmentée comme des fragments pégylés.

 13. Anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit
25 anticorps est un anticorps murin et en ce qu'il comprend une chaîne légère de séquence d'acide aminé SEQ ID No. 9, ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 9, et une chaîne lourde de séquence d'acide aminé SEQ ID No. 10, ou de séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 10.

30 14. Anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit

anticorps est un anticorps chimérique et comprend en outre les régions constantes de chaîne légère et de chaîne lourde dérivées d'un anticorps d'une espèce hétérologue à la souris.

15 15. Anticorps chimérique, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon la revendication 14, caractérisé en ce que ladite espèce hétérologue est l'Homme.

16. Anticorps humanisé, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon la revendication 15, caractérisé en ce que les régions constantes de chaîne légère et de chaîne lourde dérivées d'un anticorps humain sont respectivement la 10 région lambda ou kappa et gamma-1, gamma-2 ou gamma-4.

17. Hybridome murin déposé à la CNCM, Institut Pasteur, Paris, le 6 juillet 2006 sous le numéro I-3646.

18. Anticorps sécrété par l'hybridome selon la revendication 17.

19. Anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, 15 selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est capable de se lier spécifiquement à la protéine JAM-A (d'après la nomenclature anglaise « Junctional Adhesion Molecules »).

20. Anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il présente un Kd pour la protéine JAM-A 20 compris entre environ 1 nM et 1 pM et plus préférentiellement entre 10 et 40 pM.

21. Acide nucléique isolé caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les acides nucléiques suivants :

a) un acide nucléique, ADN ou ARN, codant pour un anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'une des revendications 1 à 16 et 18 25 à 20 ;

b) un acide nucléique complémentaire d'un acide nucléique tel que défini en a) ;

c) un acide nucléique d'au moins 18 nucléotides capable d'hybrider dans des conditions de forte stringence avec au moins l'un des CDRs de séquence d'acide nucléique SEQ ID No. 11, 12, 13, 14, 15 ou 16; et

30 d) un acide nucléique d'au moins 18 nucléotides capable d'hybrider dans des conditions de forte stringence avec au moins la chaîne légère de séquence d'acides

nucléiques SEQ ID No. 17 et/ou la chaîne lourde de séquence d'acides nucléiques SEQ ID No. 18.

22. Vecteur comprenant un acide nucléique selon la revendication 21.

23. Cellule hôte comprenant un vecteur selon la revendication 22.

5 24. Animal transgénique à l'exception de l'Homme comprenant une cellule transformée par un vecteur selon la revendication 23.

25. Procédé de production d'un anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'une des revendications 1 à 16 et 18 à 20, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

10 a) la culture dans un milieu et conditions de culture appropriés d'une cellule selon la revendication 23 ; et

b) la récupération desdits anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, ainsi produits à partir du milieu de culture ou desdites cellules cultivées.

15 26. Anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 et 18 à 20, caractérisé en ce qu'il consiste en un anticorps bispécifique et en ce qu'il comprend, un second motif capable d'interagir avec un récepteur impliqué dans le développement des tumeurs, choisi parmi les récepteurs VEGFR, VEGF, EGFR, IGF-1R, HER2neu, HGF, cMET, FGF, CXCR4
20 et CXCR2.

27. Anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'une des revendications 1 à 16, 18 à 21 et 26 à titre de médicament.

28. Composition comprenant à titre de principe actif un composé consistant en un anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'une
25 des revendications 1 à 16, 18 à 21, 26 et 27.

29. Composition selon la revendication 28, caractérisée en ce qu'elle comprend, en outre, comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, un anticorps anti-tumoral autre qu'un anticorps dirigé contre la protéine JAM-A.

30. Composition selon la revendications 28 ou 29, caractérisée en ce qu'elle comprend, en outre, comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, un agent cytotoxique/cytostatique.

5 31. Composition selon la revendication 30, caractérisée en ce que ledit agent cytotoxique/cytostatique est couplé chimiquement à au moins l'un des éléments de ladite composition pour une utilisation simultanée.

32. Composition selon l'une quelconque des revendications 28 à 31, caractérisée en ce que l'un, au moins, desdits anticorps, ou l'un de leurs composés dérivés ou fragments fonctionnels, est conjugué avec une toxine cellulaire et/ou un
10 radioélément.

33. Composition selon l'une des revendications 28 à 32, à titre de médicament.

34. Utilisation d'un anticorps, ou l'un de ses composés dérivés ou fragments fonctionnels, selon l'une des revendications 1 à 16, 18 à 20, 26 et 27 et/ou d'une
15 composition selon l'une quelconque des revendications 28 à 33 pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement d'une maladie liée à une prolifération de cellules tumorales.

35. Utilisation selon la revendication 34, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement du cancer.

20 36. Utilisation selon la revendication 35, caractérisée en ce que ledit cancer est un cancer choisi parmi le cancer de la prostate, les ostéosarcomes, le cancer du poumon, le cancer du sein, le cancer de l'endomètre, le myélome multiple, le cancer des ovaires, le cancer du pancréas et le cancer du côlon.

25 37. Utilisation selon la revendication 36, caractérisée en ce que ledit cancer est un cancer choisi parmi le cancer du sein estrogène dépendant, le cancer du poumon non à petites cellules, le cancer du côlon et le cancer du pancréas.

2/12

IGKV19-93*01 (IMGT name) : 98.56% (275/279 nt)

```

----- FR1-IMGT -----
6F4 VL domain (AA)      D I Q M T Q S P S S L S A S L G G K V T
6F4 VL domain          gacatccagatgacacagtcctccatcctcactgtctgcacatctctgggaggcaaagtcacc
AJ235935 IGKV19-93*01 -----

----->_____ CDR1-IMGT -----<-----
6F4 VL domain (AA)      I T C K A S Q D I N N Y I A
6F4 VL domain          atcacttgcaaggcaagccaagacattaacaattat.....atagct
AJ235935 IGKV19-93*01 -----g-----

----- FR2-IMGT ----->_____ CDR
6F4 VL domain (AA)      W Y Q H K P G K G P R L L I H Y T S
6F4 VL domain          tggtaacaacacaagcctggaaaaggtcctaggctgctcatacattacacatct.....
AJ235935 IGKV19-93*01 -----

2-IMGT -----<-----
6F4 VL domain (AA)      T L Q A G I P S R F S G S G
6F4 VL domain          .....acattacaagcaggcatccca...tcaaggttcagtggaagtggg
AJ235935 IGKV19-93*01 -----gc-----

----- FR3-IMGT -----
6F4 VL domain (AA)      S G R D Y S F S I S N L E P E D I G
6F4 VL domain          .....tctgggagagattattccttcagcatcagcaacctggagcctgaagatattgga
AJ235935 IGKV19-93*01 -----c-----

----->_____ CDR3-IMGT -----<----- FR4-IMGT
6F4 VL domain (AA)      T Y Y C L Q Y D N L W T F G G G T K L E
6F4 VL domain          acttattattgtctacagtatgataatctgtggacgttcggtggaggcaccaagctggaa
AJ235935 IGKV19-93*01 -----tctac-----

----->
6F4 VL domain (AA)      I K
6F4 VL domain          atcaaac

```

FIGURE 2A

IGKJ1*01 (nomenclature IMGT) : 100.0% (38/38 nt)

```

CDR3-IMGT -----<----- FR4-IMGT ----->
6F4 VL domain (AA)      W T F G G G T K L E I K
6F4 VL domain          gtggacggttcggtggaggcaccaagctggaaatcaaac
V00777 IGKJ1*01 -----

```

FIGURE 2B

5/12

```

6F4 VH domain (AA)
6F4 VH domain
AF304556 IGHV1S135*01
<----- FR1-IMGT -----
E I Q L Q Q S G P   E L V K P G A S V K
gagatccagctgcagcagctggacct...gagctggtgaagcctgggcttcagtgaag
-----

-----> CDR1-IMGT <-----
V S C K A S G Y S F T D Y S   M Y
gtatcctgcaaggcttctggttactcattcactgactacagc.....atgtac
-----a-----

----- FR2-IMGT -----> CDR
W V K Q S H G K S L E W I G Y I D P Y N
tgggtgaagcagagccatggaaagaccttgagtggattggatatattgatccttacaat
-----

2-IMGT <-----
G G T   R Y N Q K F K   G K A T L T V
ggtggtact.....aggtacaaccagaagttcaag...ggcaaggccacattgactgtt
-----c-----

----- FR3-IMGT -----
D K S S S T A F M H L N S L T S E D S A
gacaagtcctccagcacagccttcatgcatctcaacagcctgacatctgaggactctgca
-----

-----> CDR3-IMGT <-----
V Y Y C A R Q T D Y F D Y W G Q G T T L
gtctattactgtgcaagacagacggactactttgactactggggccaaggcaccactctc
-----

6F4 VH domain (AA)
6F4 VH domain
AF304556 IGHV1S135*01
T V S S
6F4 VH domain
acagtctcctcag

```

FIGURE 5A

IGHD-ST4*01 (IMGT name) : 80.00% (4/5 nt)

```

6F4 VH domain (AA)
6F4 VH domain
M23243 IGHV1S135*01
          CDR3-IMGT
          A R Q T D Y
          cagacg
          .----agctcgggctac

```

FIGURE 5B

IGHJ2*01 (IMGT name) : 100.00% (48/48 nt)

```

6F4 VL domain (AA)
6F4 VH domain
V00770 IGHJ2*01
          CDR3-IMGT <-----FR4----->
          Q T D Y F D Y W G Q G T T L T V S S
          cagacggactactttgactactggggccaaggcaccactctcacagctctcctca
          .....

```

FIGURE 5C

6/12

IGHV1-f*01 (IMGT name) : 75.34% (217/288 nt)

```

<-----FR1 - IMGT-----
1          5          10          15
6F4 VH domain   gag atc cag ctg cag cag tct gga cct ... gag ctg gtg aag cct
Z12305 IGHV1-f*01  E I Q L Q Q S G P ... E L V K P
                   g--  --gta  --g g--  ...  g-- aa-  ---
                   V      V      A      V      K

----->
          20          25          30
6F4 VH domain   ggg gct tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc
Z12305 IGHV1-f*01  G A S V K V S C K A S G Y S F
                   a--  --a a-c  ---  -t-  --a  --- a-c  ---
                   T      I      V      T

-----CDR1 - IMGT-----<-----
          35          40          45
6F4 VH domain   act gac tac agc ... .. . atg tac tgg gtg aag cag agc
Z12305 IGHV1-f*01  T D Y S ... .. . M Y W V K Q S
                   ta-  ... .. . c--  --- c-a  --- gc-
                   Y      H      Q      A

-----FR2 - IMGT----->-----
          50          55          60
6F4 VH domain   cat gga aag agc ctt gag tgg att gga tat att gat cct tac aat
Z12305 IGHV1-f*01  H G K S L E W I G Y I D P Y N
                   -c-  --a g-g  ---  --g  --- ct- g--  --- g-a g--
                   P      G      M      L      V      E      D

-----IMGT-----<-----
          65          70          75
6F4 VH domain   ggt ggt act ... .. . agg tac aac cag aag ttc aag ... ggc aag
Z12305 IGHV1-f*01  G G T ... .. . R Y N Q K F K ... G K
                   -aa --a ... .. . -ta --- gca g--  --- c--  ...  --- -ga
                   E      I      A      E      Q      R

-----FR3 - IMGT-----
          80          85          90
6F4 VH domain   gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc aca gcc ttc atg cat
Z12305 IGHV1-f*01  A T L T V D K S S S T A F M H
                   -t-  --c a-a --c -cg  --- -c-  --t a-a ga-  --- -a-  --- g-g
                   V      I      A      T      T      D      Y      E

----->-----
          95          100          104
6F4 VH domain   ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt gca
Z12305 IGHV1-f*01  L N S L T S E D S A V Y Y C A
                   -g -g  ---  -g-  ---  --- a-g --c --g  ---  ---
                   S      R      T

-----CDR3 - IMGT-----
6F4 VH domain   aga cag acg gac tac ttt gac tac tgg ggc caa gcc acc act ctc
Z12305 IGHV1-f*01  R Q T D Y F D Y W G Q G T T L
                   -c-
                   T

```

FIGURE 6A

8/12

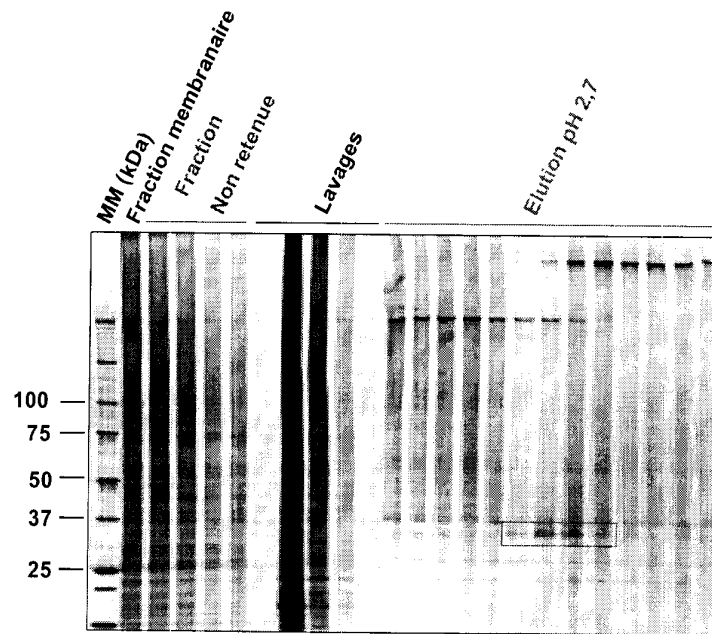


FIGURE 8A

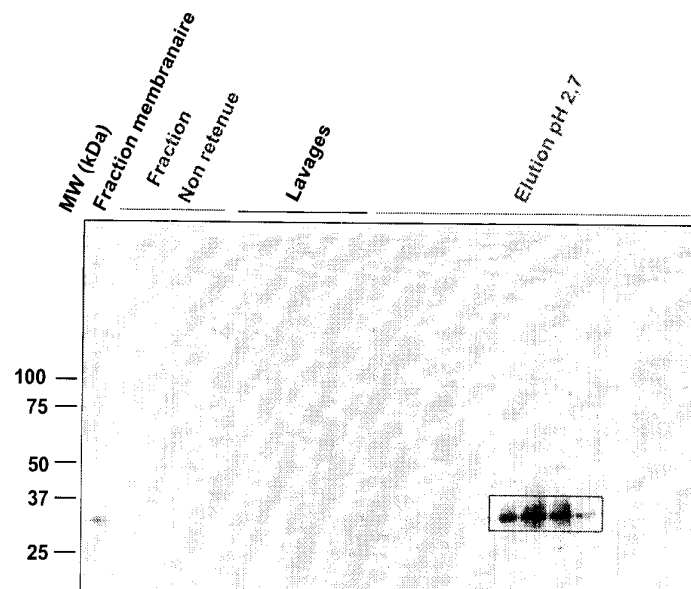


FIGURE 8B

9/12

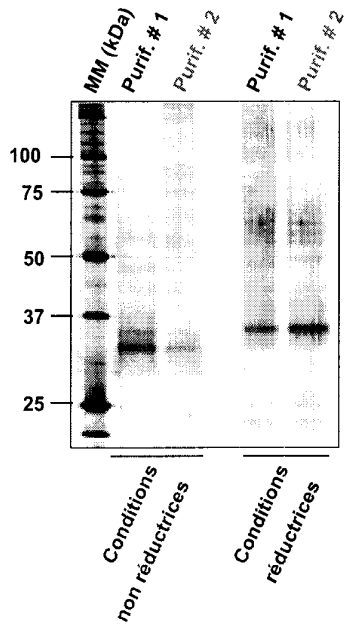


FIGURE 9A

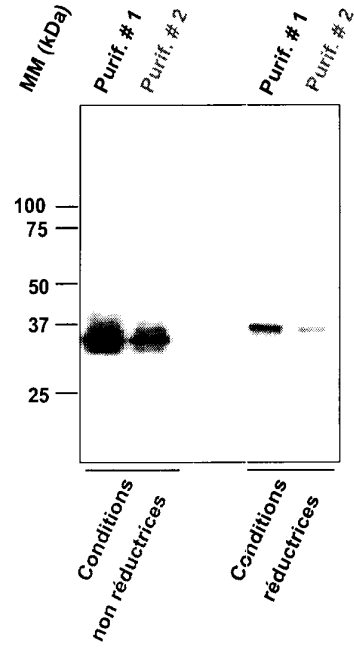


FIGURE 9B

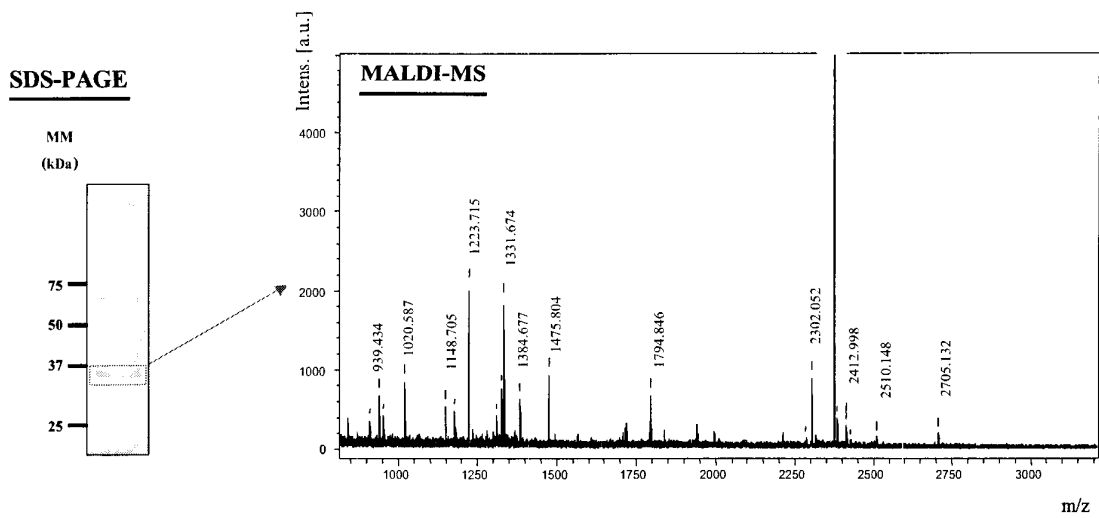


FIGURE 10

10/12

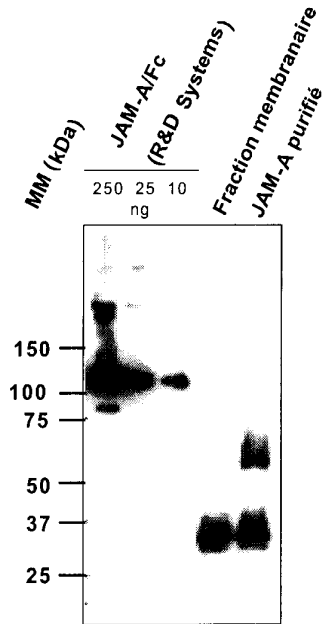


FIGURE 11A

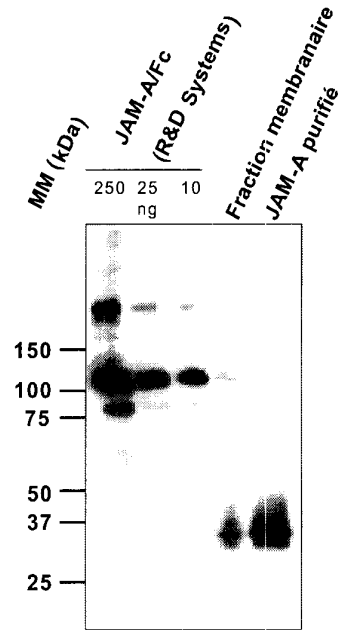


FIGURE 11B

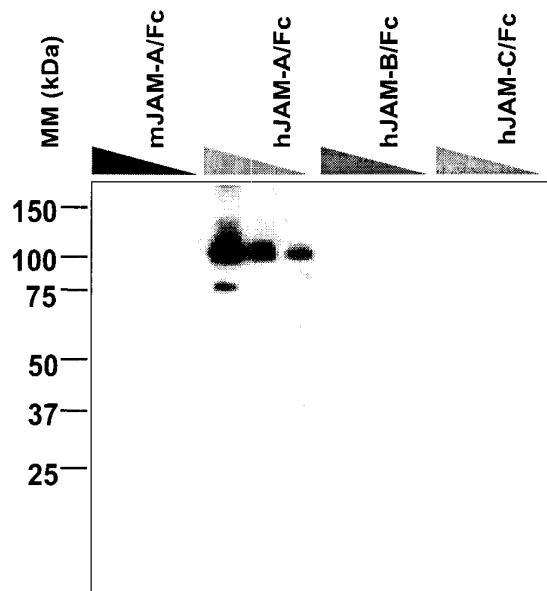


FIGURE 12

11/12

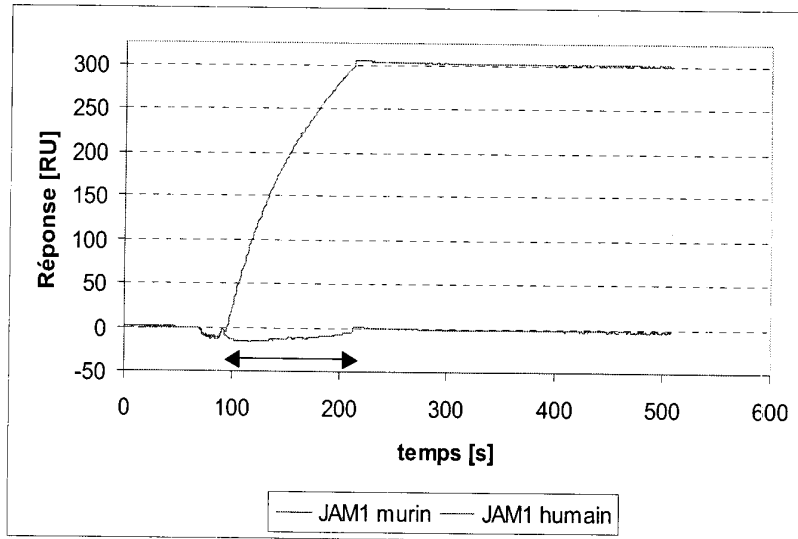


FIGURE 13

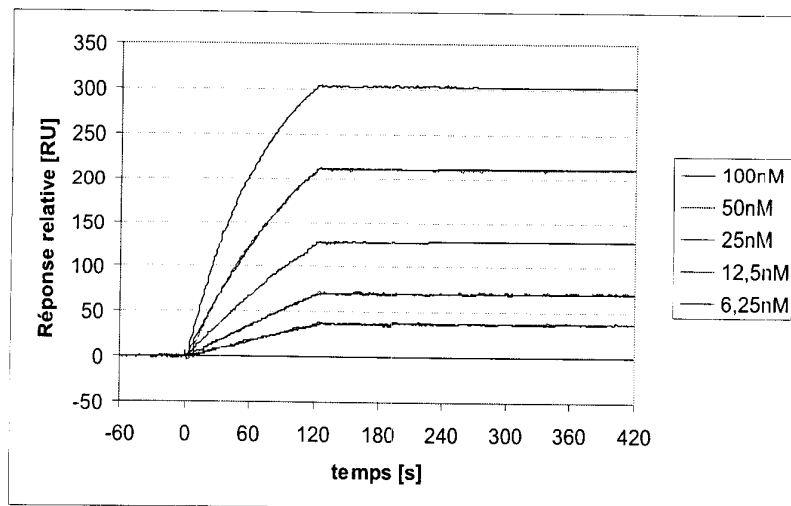


FIGURE 14

12/12

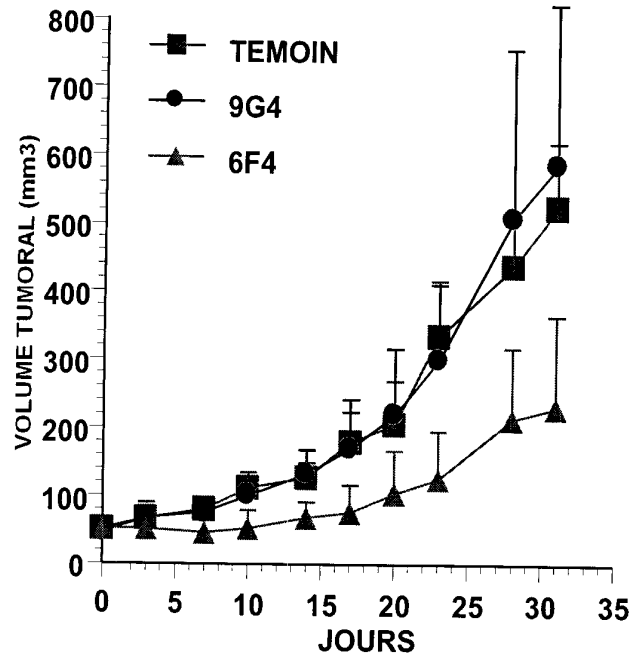


FIGURE 15

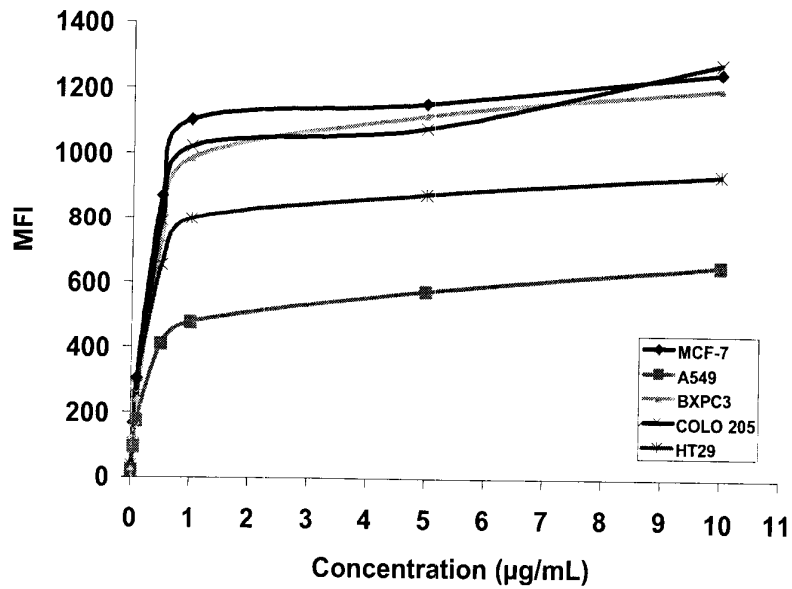


FIGURE 16

LISTE DE SEQUENCES

<110> Pierre Fabre Médicament

<120> Anticorps anti-prolifération

<130> D24958

<160> 44

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 1

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Ile Ala
 1 5 10

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 2

Thr Asp Tyr Ser Met Tyr
 1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 3

Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Ala
 1 5

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 4

Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 5

<211> 8
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 5

Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Trp Thr
 1 5

<210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 6

Gln Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 7
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 7

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

<210> 8
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 8

Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Ser Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe
 65 70 75 80

<212> ADN
 <213> mus musculus

 <400> 12

 actgactaca gcatgtac 18

 <210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> mus musculus

 <400> 13

 tacacatcta cattacaagc a 21

 <210> 14
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> mus musculus

 <400> 14

 tatattgatc cttacaatgg tggactagg tacaaccaga agttcaaggg c 51

 <210> 15
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> mus musculus

 <400> 15

 ctacagtatg ataatctgtg gacg 24

 <210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> mus musculus

 <400> 16

 cagacggact actttgacta c 21

 <210> 17
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> mus musculus

 <400> 17

 gacatccaga tgacacagtc tccatcctca ctgtctgcat ctctgggagg caaagtcacc 60
 atcacttgca aggcaagcca agacattaac aattatatag cttggtacca acacaagcct 120
 ggaaaaggtc ctaggctgct catacattac acatctacat tacaagcagg catcccatca 180
 aggttcagtg gaagtgggtc tgggagagat tattccttca gcatcagcaa cctggagcct 240
 gaagatattg gaacttatta ttgtctacag tatgataatc tgtggacggt cggtggagggc 300
 accaagctgg aatcaaaa 318

<210> 18
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> mus musculus

<400> 18

gagatccagc	tgcagcagtc	tggacctgag	ctgggtgaagc	ctggggcttc	agtgaaggta	60
tcttgcaagg	cttctgggta	ctcattcact	gactacagca	tgtactgggt	gaagcagagc	120
catggaaaga	gccttgagtg	gattggatat	attgatcctt	acaatgggtg	tactaggtac	180
aaccagaagt	tcaagggcaa	ggccacattg	actggtgaca	agtccctcag	cacagccttc	240
atgcatctca	acagcctgac	atctgaggac	tctgcagtct	attactgtgc	aagacagacg	300
gactactttg	actactgggg	ccaaggcacc	actctcacag	tctcctca		348

<210> 19
 <211> 639
 <212> ADN
 <213> mus musculus

<400> 19

gacatccaga	tgacacagtc	tccatcctca	ctgtctgcat	ctctgggagg	caaagtcacc	60
atcacttgca	aggcaagcca	agacattaac	aattatatag	cttgggtacca	acacaagcct	120
ggaaaaggtc	ctaggctgct	catacattac	acatctacat	tacaagcagg	catcccatca	180
aggttcagtg	gaagtggttc	tgggagagat	tattccttca	gcatcagcaa	cctggagcct	240
gaagatattg	gaacttatta	ttgtctacag	tatgataatc	tgtggacggt	cggtggaggc	300
accaagctgg	aaatcaaacg	ggctgatgct	gcaccaactg	tatccatctt	cccaccatcc	360
agtgagcagt	taacatctgg	aggtgcctca	gtcgtgtgct	tcttgaacaa	cttctacccc	420
aaagacatca	atgtcaagtg	gaagattgat	ggcagtgaac	gacaaaatgg	cgctcctgac	480
agttggactg	atcaggacag	caaagacagc	acctacagca	tgagcagcac	cctcacgttg	540
accaaggacg	agtatgaacg	acataacagc	tatacctgtg	aggccactca	caagacatca	600
acttcaccca	ttgtcaagag	cttcaacagc	aatgagtgt			639

<210> 20
 <211> 1320
 <212> ADN
 <213> mus musculus

<400> 20

gagatccagc	tgcagcagtc	tggacctgag	ctgggtgaagc	ctggggcttc	agtgaaggta	60
tcttgcaagg	cttctgggta	ctcattcact	gactacagca	tgtactgggt	gaagcagagc	120
catggaaaga	gccttgagtg	gattggatat	attgatcctt	acaatgggtg	tactaggtac	180
aaccagaagt	tcaagggcaa	ggccacattg	actggtgaca	agtccctcag	cacagccttc	240
atgcatctca	acagcctgac	atctgaggac	tctgcagtct	attactgtgc	aagacagacg	300
gactactttg	actactgggg	ccaaggcacc	actctcacag	tctcctcagc	caaaacaaca	360
gccccatcgg	tctatccact	ggccctgga	tctgctgccc	aaactaactc	catggtgacc	420
ctgggatgcc	tgggtcaagg	ctatttccct	gagccagtga	cagtgcacct	gaactctgga	480
tccctgtcca	gcgggtgtgca	caccttcca	gctgtcctgc	agtctgacct	ctacactctg	540
agcagctcag	tgactgtccc	ctccagcacc	tggcccagcg	agaccgtcac	ctgcaacggt	600
gcccaccg	ccagcagcac	caaggtggac	aagaaaattg	tgccagggg	ttgtggttgt	660
aagccttgca	tatgtacagt	cccagaagta	tcactctgtct	tcacttccc	cccaaagccc	720
aaggatgtgc	tcaccattac	tctgactcct	aaggctcagct	gtgtgtggt	agacatcagc	780
aaggatgac	ccgaggtcca	gttcagctgg	ttttagatg	atgtggaggt	gcacacagct	840
cagacgcaac	cccgggagga	gcagttcaac	agcactttcc	gctcagtcag	tgaacttccc	900
atcatgcacc	aggactggct	caatggcaag	gagttcaaat	gcaggggtcaa	cagtgacagct	960
tccctgccc	ccatcgagaa	aaccatctcc	aaaaccaaag	gcagaccgaa	ggctccacag	1020

gtgtacacca ttccacctcc caaggagcag atggccaagg ataaagtcag tctgacctgc 1080
 atgataacag acttcttccc tgaagacatt actgtggagt ggcagtggaa tgggcagcca 1140
 gcggagaact acaagaacac tcagcccatc atggacacag atggctctta cttcgtctac 1200
 agcaagctca atgtgcagaa gagcaactgg gaggcaggaa atactttcac ctgctctgtg 1260
 ttacatgagg gctgcacaa ccaccatact gagaagagcc tctcccactc tcttggtaaa 1320

<210> 21
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 21

Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His
 1 5 10 15
 Gly Ala Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30
 Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
 35 40 45
 Ile Asn Lys Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser
 85 90 95
 Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp
 100 105 110
 Asn Leu Leu
 115

<210> 22
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 22

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 23
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 23

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Gln Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Ser Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser
 35 40 45
 Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60
 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val
 65 70 75 80
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 100 105 110
 Tyr Asp Asn Leu Pro
 115

<210> 24
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> hoo sapiens

<400> 24

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 25
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 25

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

<210> 26
 <211> 2
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 26

Gln Thr
 1

<210> 27
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 27

Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 1 5 10 15

<210> 28
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 28

```

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

```

<210> 29
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 29

```

Met Ser Val Ser Phe Leu Ile Phe Leu Pro Val Leu Gly Leu Pro Trp
1          5          10          15
Gly Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val
20          25          30
Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser
35          40          45
Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser
50          55          60
Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr
65          70          75          80
Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp
85          90          95
Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu
100          105          110
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
115          120

```

<210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 30

```

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1          5          10          15

```

<210> 31
 <211> 643
 <212> ADN
 <213> mus musculus

<400> 31

cagatgaagc	tgatttgcat	gtgctgagat	catattctac	tgccccagag	atttaataat	60
ctgatcatac	acactccaac	agtcattcct	ggtcaggaga	cgttgtagaa	atgagaccgt	120
ctattcagtt	cctggggctc	ttgttgttct	ggcttcatgg	taaggagttt	aacattgaat	180
atgctaaaaa	gagtatgtga	tcaggaatth	ctggctcttc	agaaaaatct	tctttgaata	240
taattaatth	catagggatt	tgtgttctth	ttaattatag	gtgctcagtg	tgacatccag	300
atgacacagt	ctccatcctc	actgtctgca	tctctgggag	gcaaagtcac	catcacttgc	360
aaggcaagcc	aagacattaa	caagtatata	gcttggtacc	aacacaagcc	tgaaaagggt	420
cctaggctgc	tcatacatta	cacatctaca	ttacagccag	gcatcccatc	aaggttcagt	480
ggaagtgggt	ctgggagaga	ttattccttc	agcatcagca	acctggagcc	tgaagatatt	540
gcaacttatt	attgtctaca	gtatgataat	cttctaccca	cagtgataca	aatcataaca	600
aaaaccaccc	aggggaagcag	aagtgagagg	ctaggttgcc	cac		643

<210> 32
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> mus musculus

<400> 32

tggacgttcg	gtggaggcac	caagctggaa	atcaaactg			39
------------	------------	------------	-----------	--	--	----

<210> 33
 <211> 667
 <212> ADN
 <213> homo sapiens

<400> 33

ctgcagctgt	gccagcctg	ccctatcccc	tgctgatttg	catgttcgca	gagcacagcc	60
ccctgccctg	aagacttatt	aataggctgg	tcgcaccctg	tcaggagtc	agtcccaacc	120
aggacacagc	atggacatga	gggtccctgc	tcagctcctg	gggctcctgc	agctctggct	180
ctcaggtgaag	gaaggataac	actaggaatt	ttctcagcca	gtgtgctcag	tacagcctgg	240
ctcttgatgg	aagccttctc	ataaatatgac	taatagtatg	aatatthtg	tttatgthtc	300
taatcgcagg	tgccagatgt	gacatccaga	tgaccagtc	tccatcctcc	ctgtctgcat	360
ctgtaggaga	cagagtcacc	atcacttgcc	aggcgagtc	ggacattagc	aactatthaa	420
attggtatca	gcagaaacca	gggaaagccc	ctaagctcct	gatctacgat	gcatccaatt	480
tgaaaacagg	ggtcccatca	aggttcagtg	gaagtggatc	tgggacagat	thtactthca	540
ccatcagcag	cctgcagcct	gaagatattg	caacatatta	ctgtcaacag	tatgataatc	600
tcctcccac	agtgtaacaa	gtcataacat	aatcaccca	ggggagcaga	tgctgagggc	660
tcagctg						667

<210> 34
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> homo sapiens

<400> 34

tggacgttcg	gccaaaggac	caaggtggaa	atcaaac			37
------------	------------	------------	---------	--	--	----

<210> 35
 <211> 294
 <212> ADN
 <213> mus musculus

<400> 35

gagatccagc	tcagcagtc	tgacactgag	ctggtgaagc	ctggggcttc	agtgaagta	60
tcctgcaagg	cttctggta	ctcattcact	gactacaaca	tgtactgggt	gaagcagagc	120
catggaaaga	gccttgagtg	gattggatat	attgatcett	acaatggtgg	tactagctac	180
aaccagaagt	tcaagggcaa	ggccacattg	actgttgaca	agtcctccag	cacagccttc	240
atgcatctca	acagcctgac	atctgaggac	tctgcagtct	attactgtgc	aaga	294

<210> 36
 <211> 163
 <212> ADN
 <213> mus musculus

<400> 36

aagcttgccc	aggaaccact	agtgctcaca	cagctctgcc	cacaggggaa	acctaaccat	60
gcctgcccc	tactcagcag	gaaggctctg	aagctctgag	aggatttga	acaagttact	120
gtcacagtga	gacagctcgg	gctaccatgt	aagaaaagct	caa		163

<210> 37
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> mus musculus

<400> 37

tactttgact	actggggcca	aggcaccact	ctcacagtct	ctca		45
------------	------------	------------	------------	------	--	----

<210> 38
 <211> 294
 <212> ADN
 <213> homo sapiens

<400> 38

gaggtccagc	tggtacagtc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctggggctac	agtgaaaatc	60
tcctgcaagg	tttctggata	caccttcacc	gactactaca	tgactgggt	gcaacaggcc	120
cctggaaaag	ggcttgagtg	gatgggactt	gttgatcctg	aagatggtga	aacaatatac	180
gcagagaagt	tccagggcag	agtcaccata	accgcgga	cgtctacaga	cacagcctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	aaca	294

<210> 39
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> homo sapiens

<400> 39

ggtacaactg	gaacgac					17
------------	---------	--	--	--	--	----

<210> 40

<211> 46
 <212> ADN
 <213> homo sapiens

<400> 40

tactttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cctcag

46

<210> 41
 <211> 299
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 41

Met Gly Thr Lys Ala Gln Val Glu Arg Lys Leu Leu Cys Leu Phe Ile
 1 5 10 15
 Leu Ala Ile Leu Leu Cys Ser Leu Ala Leu Gly Ser Val Thr Val His
 20 25 30
 Ser Ser Glu Pro Glu Val Arg Ile Pro Glu Asn Asn Pro Val Lys Leu
 35 40 45
 Ser Cys Ala Tyr Ser Gly Phe Ser Ser Pro Arg Val Glu Trp Lys Phe
 50 55 60
 Asp Gln Gly Asp Thr Thr Arg Leu Val Cys Tyr Asn Asn Lys Ile Thr
 65 70 75 80
 Ala Ser Tyr Glu Asp Arg Val Thr Phe Leu Pro Thr Gly Ile Thr Phe
 85 90 95
 Lys Ser Val Thr Arg Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Thr Cys Met Val Ser
 100 105 110
 Glu Glu Gly Gly Asn Ser Tyr Gly Glu Val Lys Val Lys Leu Ile Val
 115 120 125
 Leu Val Pro Pro Ser Lys Pro Thr Val Asn Ile Pro Ser Ser Ala Thr
 130 135 140
 Ile Gly Asn Arg Ala Val Leu Thr Cys Ser Glu Gln Asp Gly Ser Pro
 145 150 155 160
 Pro Ser Glu Tyr Thr Trp Phe Lys Asp Gly Ile Val Met Pro Thr Asn
 165 170 175
 Pro Lys Ser Thr Arg Ala Phe Ser Asn Ser Ser Tyr Val Leu Asn Pro
 180 185 190
 Thr Thr Gly Glu Leu Val Phe Asp Pro Leu Ser Ala Ser Asp Thr Gly
 195 200 205
 Glu Tyr Ser Cys Glu Ala Arg Asn Gly Tyr Gly Thr Pro Met Thr Ser
 210 215 220
 Asn Ala Val Arg Met Glu Ala Val Glu Arg Asn Val Gly Val Ile Val
 225 230 235 240
 Ala Ala Val Leu Val Thr Leu Ile Leu Leu Gly Ile Leu Val Phe Gly
 245 250 255
 Ile Trp Phe Ala Tyr Ser Arg Gly His Phe Asp Arg Thr Lys Lys Gly
 260 265 270
 Thr Ser Ser Lys Lys Val Ile Tyr Ser Gln Pro Ser Ala Arg Ser Glu
 275 280 285
 Gly Glu Phe Lys Gln Thr Ser Ser Phe Leu Val
 290 295

<210> 42
 <211> 897
 <212> ADN
 <213> homo sapiens

<400> 42

```

atggggacaa aggcgcaagt cgagaggaaa ctgttgtgcc tcttcatatt ggcgatcctg      60
ttgtgctccc tggcattggg cagtgttaca gtgcactcct ctgaacctga agtcagaatt      120
cctgagaata atcctgtgaa gttgtcctgt gcctactcgg gcttttcttc tccccgtgtg      180
gagtggaagt ttgaccaagg agacaccacc agactcgttt gctataataa caagatcaca      240
gcttcctatg aggaccgggt gaccttcttg ccaactggta tcaccttcaa gtccctgaca      300
cgggaagaca ctgggacata cacttgtatg gtctctgagg aaggcggcaa cagctatggg      360
gaggcaagg tcaagctcat cgtgcttgtg cctccatcca agcctacagt taacatcccc      420
tcctctgcca ccattgggaa ccgggcagtg ctgacatget cagaacaaga tggttcccca      480
ccttctgaat acacctgggt caaagatggg atagtgatgc ctacgaatcc caaaagcacc      540
cgtgccttca gcaactcttc ctatgtcctg aatcccacaa caggagagct ggtctttgat      600
ccctgtcag cctctgatac tggagaatac agctgtgagg cacggaatgg gtatgggaca      660
cccattgactt caaatgctgt gcgcatggaa gctgtggagc ggaatgtggg ggatcatcgtg      720
gcagccgtcc ttgtaaccct gattctcctg ggaatccttg tttttggcat ctggtttgcc      780
tatagccgag gccactttga cagaacaag aaagggactt cgagtaagaa ggtgatttac      840
agccagccta gtgcccgaag tgaaggagaa ttcaaacaga cctcgtcatt cctggtg      897

```

<210> 43

<211> 259

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 43

```

Met Gly Thr Lys Ala Gln Val Glu Arg Lys Leu Leu Cys Leu Phe Ile
1          5          10          15
Leu Ala Ile Leu Pro Glu Asn Asn Pro Val Lys Leu Ser Cys Ala Tyr
20          25          30
Ser Gly Phe Ser Ser Pro Arg Ala Ala Ser Tyr Glu Asp Arg Val Thr
35          40          45
Phe Leu Pro Thr Gly Ile Thr Phe Lys Ser Val Thr Arg Glu Asp Thr
50          55          60
Gly Thr Tyr Thr Cys Met Val Ser Glu Glu Gly Gly Asn Ser Tyr Gly
65          70          75          80
Glu Val Lys Val Lys Leu Ile Val Leu Val Pro Pro Ser Lys Pro Thr
85          90          95
Val Asn Ile Pro Ser Ser Ala Thr Ile Gly Asn Arg Ala Val Leu Thr
100         105         110
Cys Ser Glu Gln Asp Gly Ser Pro Pro Ser Glu Tyr Thr Trp Phe Lys
115         120         125
Asp Gly Ile Val Met Pro Thr Asn Pro Lys Ser Thr Arg Ala Phe Ser
130         135         140
Asn Ser Ser Tyr Val Leu Asn Pro Thr Thr Gly Glu Leu Val Phe Asp
145         150         155         160
Pro Leu Ser Ala Ser Asp Thr Gly Glu Tyr Ser Cys Glu Ala Arg Asn
165         170         175
Gly Tyr Gly Thr Pro Met Thr Ser Asn Ala Val Arg Met Glu Ala Val
180         185         190
Glu Arg Asn Val Gly Val Ile Val Ala Ala Val Leu Val Thr Leu Ile
195         200         205
Leu Leu Gly Ile Leu Val Phe Gly Ile Trp Phe Ala Tyr Ser Arg Gly
210         215         220
His Phe Asp Arg Thr Lys Lys Gly Thr Ser Ser Lys Lys Val Ile Tyr
225         230         235         240
Ser Gln Pro Ser Ala Arg Ser Glu Gly Glu Phe Lys Gln Thr Ser Ser
245         250         255
Phe Leu Val

```

<210> 44
 <211> 777
 <212> ADN
 <213> homo sapiens

<400> 44

```

atggggacaa aggcgcaagt cgagaggaaa ctggtgtgcc tcttcatatt ggcgatcctt    60
cctgagaata atcctgtgaa gttgtcctgt gcctactcgg gcttttcttc tccccgtgca    120
gcttcctatg aggaccgggt gaccttcttg ccaactggta tcaccttcaa gtccgtgaca    180
cgggaagaca ctgggacata cacttgtatg gtctctgagg aaggcggcaa cagctatggg    240
gaggtaaagg tcaagctcat cgtgcttgtg cctccatcca agcctacagt taacatcccc    300
tcctctgcca ccattgggaa ccgggcagtg ctgacatgct cagaacaaga tggttcccca    360
ccttctgaat acacctggtt caaagatggg atagtgatgc ctacgaatcc caaaagcacc    420
cgtgccttca gcaactcttc ctatgtcctg aatcccacaa caggagagct ggtctttgat    480
cccctgtcag cctctgatac tggagaatac agctgtgagg cacggaatgg gtatgggaca    540
cccattgactt caaatgctgt gcgcatggaa gctgtggagc ggaatgtggg ggtcatcgtg    600
gcagccgtcc ttgtaacctt gattctcctg ggaatcttgg tttttggcat ctggtttgcc    660
tatagccgag gccactttga cagaacaag aaagggactt cgagtaagaa ggtgatttac    720
agccagccta gtgcccgaag tgaaggagaa ttcaaacaga cctcgtcatt cctggtg    777

```



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement national

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

FA 687165
FR 0610329

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 2005/060457 A (PROTEIN DESIGN LABS INC [US]; BALASA BALAJI [US]; TSURUSHITA NAOYA [US] 7 juillet 2005 (2005-07-07) * page 11; séquences 75,76,77 * -----	1,2,5,6, 9-12, 14-16, 19-33	C07K16/28 A61K39/395 A61P35/00 C12N5/12 C12N5/20 C12P21/08
X	WO 2006/008076 A2 (UNIV DEGLI STUDI MILANO [IT]; MANTOVANI ALBERTO [IT]; DEJANA ELISABETT) 26 janvier 2006 (2006-01-26) * revendications * -----	19-29	
A	CORVAIA NATHALIE ET AL: "BLOCKADE OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR PRODUCTION BY A2CHM, A RECOMBINANT HUMANIZED ANTI-INSULIN LIKE GROWTH FACTOR RECEPTOR I ANTIBODY" PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, NEW YORK, NY, US, vol. 47, avril 2006 (2006-04), page 280, XP001245692 ISSN: 0197-016X * abrégé * -----	1-37	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) C07K A61K C12N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
24 avril 2007		Didelon, Frédéric	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0610329 FA 687165**

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

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **24-04-2007**

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

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2005060457 A	07-07-2005	AUCUN	

WO 2006008076 A2	26-01-2006	AUCUN	
