PCT ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 5 :		(11) Numéro de publication internationale:
C07K 15/00	A1	WO 92/13886
		(43) Date de publication internationale: 20 août 1992 (20.08.92)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00075

(22) Date de dépôt international: 28 janvier 1992 (28.01.92)

(30) Données relatives à la priorité:
91/01102 31 janvier 1991 (31.01.91) FR

(71) Déposant *(pour tous les Etats désignés sauf US):* INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR).

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants *(US seulement) :* JACQUES, Yannick [FR/FR]; 32 bis, rue Noire, F-44000 Nantes (FR). SOULILLOU, Jean-Paul [FR/FR]; 32 ter, rue de l'Abbaye, F-44000 Nantes (FR). AUDRAIN, Marie [FR/FR]; 22, rue des Carmélites, F-44000 Nantes (FR). FRANÇOIS-BENDAHOU, Christine [FR/FR]; 1, rue Paul-Guilbaud, F-44800 S.-Herblain (FR).

(74) Mandataires: BERNASCONI, Jean etc. ; Cabinet Lemoine et Bernasconi, 13, bd des Batignolles, F-75008 Paris (FR).

(81) Etats désignés: AT (brevet européen), AU, BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, KR, LU (brevet européen), MC (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.

Publiée
Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: COMPOSITION OF ANTIBODIES DIRECTED AGAINST THE HUMAIN OR ANIMAL INTERLEUKIN-2 RECEIVER

(54) Titre: COMPOSITION D'ANTICORPS DIRIGES CONTRE LE RECEPTEUR DE L'INTERLEUKINE-2 HUMAINE OU ANIMALE

(57) Abstract

The composition, which is comprised of at least two antibodies, preferably monoclonal antibodies directed against the interleukin-2 receiver, includes an anti-p55 antibody and an anti-p75 antibody providing for the inhibition of the binding of interleukin-2 to its receiver. It concerns particularly the pairs 33B3.1/TU27, 33B3.1/Tic and 33B3.1/A41. The composition is useful as active agent against rejection of members and marrow grafting, against leucemia and positive CD25 lymphomas as well as against auto-immune pathologies such as type 1 diabetes, rheumatoid polyarthritis, ankylosing spondylarthritis, multiple sclerosis and myasthenia gravis.

(57) Abrégé

La composition, qui comprend au moins deux anticorps, de préférence monoclonaux, dirigés contre le récepteur de l'interleukine-2, comporte un anticorps anti-p55 et un anticorps anti-p75 assurant l'inhibition de la liaison de l'interleukine-2 à son récepteur. Il s'agit notamment des couples 33B3.1/TU27, 33B3.1/Tic et 33B3.1/A41. La composition est utilisable comme agent actif contre les rejets d'organes et de greffes de moelle, contre les leucémies et lymphomes CD25-positifs ainsi que contre les pathologies auto-immunes telles que le diabète de type 1, la polyarthrite rhumatoïde, la spondylarthrite ankylosante, la sclérose en plaques et la myasthénia gravis.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	**ES**	Espagne	**MG**	Madagascar
AU	Australie	**FI**	Finlande	**ML**	Mali
BB	Barbade	**FR**	France	**MN**	Mongolie
BE	Belgique	**GA**	Gabon	**MR**	Mauritanie
BF	Burkina Faso	**GB**	Royaume-Uni	**MW**	Malawi
BG	Bulgarie	**GN**	Guinée	**NL**	Pays-Bas
BJ	Bénin	**GR**	Grèce	**NO**	Norvège
BR	Brésil	**HU**	Hongrie	**PL**	Pologne
CA	Canada	**IT**	Italie	**RO**	Roumanie
CF	République Centrafricaine	**JP**	Japon	**RU**	Fédération de Russie
CG	Congo	**KP**	République populaire démocratique de Corée	**SD**	Soudan
CH	Suisse			**SE**	Suède
CI	Côte d'Ivoire	**KR**	République de Corée	**SN**	Sénégal
CM	Cameroun	**LI**	Liechtenstein	**SU**	Union soviétique
CS	Tchecoslovaquie	**LK**	Sri Lanka	**TD**	Tchad
DE	Allemagne	**LU**	Luxembourg	**TG**	Togo
DK	Danemark	**MC**	Monaco	**US**	Etats-Unis d'Amérique

Composition d'anticorps dirigés contre le récepteur de l'interleukine-2 humaine ou animale.

La présente invention se rapporte à une composition comprenant au moins deux anticorps dirigés contre le récepteur de l'interleukine-2 humaine ou animale pour assurer l'inhibition de la liaison de l'interleukine-2 (IL-2).

L'interleukine-2 joue un rôle primordial dans la régulation du système immunitaire. On sait que deux glycoprotéines membranaires sont impliquées dans la fixation de l'IL-2. Il s'agit de la chaîne p55 (chaîne α de 55 kDa ou antigène Tac) par laquelle l'IL-2 se lie à la cellule avec une faible affinité ($K_d = 10^{-8}$ M) (référence bibliographique 1) et de la chaîne p75 (chaîne β de 75 ou 70 kDa) qui présente une affinité intermédiaire pour l'IL-2 ($K_d = 10^{-9}$M) (2 à 5). Les deux chaînes se combinent pour former le récepteur de l'interleukine-2 (rIL-2) à haute affinité ($K_d = 10^{-11}$ M) (2 à 6). L'ADNc codant pour chacune des deux chaînes p55 et p75 a été identifié (6 et 7). Au contraire des cellules n'exprimant que la chaîne p55, les cellules ne présentant que la chaîne p75 répondent à l'IL-2 (8 à 10) et l'internalisent (11).

On a déjà réalisé un certain nombre d'anticorps monoclonaux dirigés contre la chaîne p55 chez l'homme et l'animal. Certains de ces anticorps ont été utilisés dans le traitement de maladies associées à une activation lymphocytaire, telles que des maladies auto-immunes expérimentales (12, 13), la leucémie à cellules T (14) et, surtout, aux transplantations d'organes (15). L'efficacité d'un anticorps monoclonal anti-p55, le 33B3.1, a été démontrée dans la prévention du rejet précoce d'allogreffes de reins chez l'homme (16 à 18).

On connaît également un certain nombre d'anticorps monoclonaux anti-p75, notamment TU27 (19), Mikβ1 et Mikβ2 (20), 2-RB (21), Tic-1 (Endogen, Boston, MA, USA) et A 41 (Boehringer).

Outre l'utilisation de certains de ces anticorps monoclonaux pour inhiber la liaison de l'IL-2 à son récepteur, on a aussi décrit dans ce dessein l'emploi d'un mélange de deux anticorps monoclonaux dirigés tous deux contre la chaîne p55 (demande de brevet européen EP-A-0.241.811).

En analysant l'effet d'anticorps monoclonaux anti-p75, en particulier l'anticorps TU27, sur la prolifération cellulaire d'un clone lymphocytaire T humain induite par l'IL-2, la déposante a trouvé que l'anticorps n'affectait pas la prolifération des cellules lorsque la concentration en IL-2 couvrait le niveau de saturation des récepteurs de haute affinité, ce qui laisse présager un niveau d'inhibition faible ou nul in vivo en présence d'IL-2. En outre, la déposante a trouvé que les anticorps anti-p55 tels que 33B3.1 n'induisaient une inhibition complète de la liaison de l'IL-2 qu'à forte concentration (> 100 nM).

La présente invention a donc pour objectif de fournir une composition d'anticorps, de préférence monoclonaux, induisant à faible concentration une inhibition efficace de la liaison de l'IL-2 et de la prolifération induite par l'IL-2.

La déposante a trouvé, de façon surprenante, que l'utilisation combinée de deux anticorps monoclonaux respectivement anti-p55 et anti-p75 présente un effet de synergie qui se traduit par une très forte inhibition de la prolifération cellulaire à des concentrations en anticorps beaucoup plus faibles que ce qui était utilisé dans l'art antérieur pour des résultats moindres. Ainsi, l'effet inhibiteur de 33B3.1 sur la prolifération induite par l'IL-2 est fortement facilité en présence de Tic-1, de TU27 ou de A41, l'inhibition de 50 % de la prolifération étant alors obtenue à des concentrations de 33B3.1 10 à 25 000 fois inférieures.

L'invention a donc pour objet une composition comprenant au moins deux anticorps dirigés contre le récepteur de l'IL-2, caractérisée en ce qu'elle comporte un anticorps anti-p55 et un anticorps anti-p75 assurant l'inhibition de la liaison de l'IL-2 à son récepteur et de la prolifération cellulaire.

Par anticorps dans le sens de l'invention, on entend aussi bien les anticorps eux-mêmes que des fragments d'anticorps tels que Fab, $F(ab')_2$ et F_v. Ces fragments peuvent être notamment obtenus par voie chimique ou génétique.

L'anticorps anti-p55 et/ou l'anticorps anti-p75 sont de préférence des anticorps monoclonaux.

Par récepteur de l'IL-2 dans le sens de l'invention, on entend aussi bien le récepteur à haute affinité

constitué par l'ensemble des chaînes p55 et p75, que lesdites chaînes seules, notamment la chaîne p75 qui présente une affinité intermédiaire permettant la liaison de l'IL-2.

Parmi les anticorps monoclonaux utilisables dans la combinaison selon l'invention, on peut citer, pour les anticorps anti-p55, notamment 33B3.1, et, pour les anticorps anti-p75, notamment TU27, Tic-1 et A41.

L'invention s'applique également aux combinaisons d'anticorps anti-p55 et anti-p75 qui ont été modifiés par voie chimique ou par recombinaison génétique, y compris les anticorps chimériques "humanisés", par exemple par le procédé décrit dans la demande de brevet FR-A-2 641 468, ainsi qu'aux anticorps bispécifiques que l'on peut dériver d'anticorps anti-p55 et anti-p75, par des procédés connus chimiques ou génétiques.

Les proportions relatives d'anticorps anti-p55 et anti-p75 peuvent varier dans d'assez larges proportions. Dans la combinaison 33B3.1/TU27 le rapport peut aller de 99/1 à 1/99, le rapport optimal étant estimé à $63^{+20}_{-20}/37^{+20}_{-20}$. Les proportions pour d'autres combinaisons peuvent être déterminées par des essais in vitro ou calculées à partir des rapports optimaux de la combinaison 33B3.1/TU27, en proportion des affinités respectives pour le récepteur de l'IL-2. Dans la combinaison 33B3.1/Tic-1, le rapport optimal est estimé à $20 \pm 10 / 80 \pm 10$; dans la combinaison 33B3.1 / A41, le rapport optimal est estimé à $80 \pm 10 / 20 \pm 10$.

La composition selon l'invention est utilisable notamment comme agent actif contre les rejets d'organes et de greffes de moelle, contre les leucémies et lymphomes CD25-positifs ainsi que contre les pathologies auto-immunes

telles que le diabète de type 1, la polyarthrite rhumatoïde, la spondylarthrite ankylosante, la sclérose en plaques et la myasthénia gravis.

L'invention a donc également pour objet un procédé de traitement de ces maladies dans lequel on administre par voie parentérale, notamment par voie intraveineuse, la composition objet de l'invention, de préférence entre 1 et 50 mg par jour dans un véhicule isotonique contenant les excipients appropriés.

L'invention va être maintenant décrite plus en détail dans la description détaillée suivante, se référant au dessin annexé dans lequel :

- Les figures 1A, 1B montrent l'effet de TU27 et 33B3.1 sur la liaison de haute affinité de l'IL-2 aux cellules 4AS. Les cellules 4AS ont été incubées à 37°C pendant 30 mn avec des concentrations croissantes d'IL-2 marquée à l'iode 125, seule (■) ou en présence de TU27 (40 nM) (▲), 33B3.1 (20 nM) (Δ), ou en présence de TU27 et 33B3.1 dans les mêmes concentrations (●). La liaison non spécifique a été mesurée en présence d'un excès (100 fois) d'IL-2 non marquée (+). Le graphique A représente les courbes de liaison. Le graphique B représente l'analyse Scatchard après soustraction de la liaison non spécifique.

- La figure 2 montre l'inhibition de la liaison de TU27 marqué à l'iode 125 aux cellules 4AS, par l'IL-2. Les cellules 4AS ont été incubées à 37°C pendant 45 mn avec 2 nM de TU27 marqué et avec des concentrations croissantes d'IL-2, en l'absence (▲) et en présence (■) de 20 nM de 33B3.1.

- La figure 3 montre l'effet de TU27 et 33B3.1 sur la prolifération cellulaire IL-2-dépendante. Les cellules 4AS ont été réparties dans des plaques à 96 puits avec des

cellules DAB irradiées et des concentrations croissantes d'IL-2, en l'absence (Δ) ou en présence de 70 nM de TU27 (▲) ou de 660 nM de 33B3.1 (●).

- Les figures 4A, 4B montrent l'effet de synergie de TU27 et 33B3.1 sur l'inhibition de la prolifération cellulaire IL-2-dépendante. Les cellules 4AS ont été réparties dans des plaques à 96 puits avec des cellules DAB irradiées, 250 pM d'IL-2 et (graphique A) des concentrations croissantes de 33B3.1 en l'absence (Δ) ou en présence (▲) de 70 nM de TU27 ou (graphique B) des concentrations croissantes de TU27 en l'absence (■) ou en présence (▲ de 25 nM de 33B3.1.

- Les figures 5A, 5B comparent les effets de synergie de 33B3.1 et de différents anti-p75 sur la prolifération IL-2 dépendante des celluless 4AS. Les cellules ont été réparties dans des plaques à 96 puits avec des cellules DAB irradiées, 250 pM d'IL2 et les quantités en anticorps suivantes : (graphique A) concentrations croissantes en 33B3.1 en l'absence (●) ou en présence de 20 nM de Tic-1 (Δ), de 20 nM de TU27 (▲) ou de 20 nM de A41 (o) ; (graphique B) 10 nM de 33B3.1 en présence de concentration croissantes de Tic-1 (●), de TU27 (o) ou de A41 (▲) ;

- La figure 6 compare les effets synergiques de 33B3.1 et A41 sur différents modèles cellulaires de prolifération IL-2-dépendante. Les cellules 4AS (□ , ■) ou les PBL stimulés par PHA (o , ●) ou OKT3 (Δ , ▲) sont répartis dans des plaques 96 puits en présence de 250 pM d'IL2 et des quantités croissantes de 33B3.1 en l'absence (□ , o , Δ) ou en présence (■ , ● , ▲) de 20 nM de A41.

MATERIELS ET METHODES

1 - Cellules

Le clone 4AS, disponible chez les auteurs des articles référencés 22 et 23, est issu d'une série de clones produits par dilutions limites à partir d'une allogreffe de rein rejetée (22, 23). Il a été cultivé en milieu RPMI 1640 (GIBCO, Glasgow, Ecosse) supplémenté avec 10 % de sérum humain (CTS, Nantes, France) et 1 nM de rIL-2 (Roussel Uclaf) et a été stimulé pendant une semaine en présence de cellules B transformées par l'EBV et irradiées. Ces cellules B ont été isolées à partir de splénocytes du donneur de greffon rénal et sont disponibles chez les mêmes auteurs. Cette lignée cellulaire (appelée lignée cellulaire DAB) a été cultivée en milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal (SEBAK, Paris, France).

Les lymphocytes du sang périphérique (PBL) ont été purifiés à partir de poches d'hémochromatoses sur coussin de Ficoll. Ils sont stimulés pendant 4 jours en présence soit de Phytohémaglutinine à 1 % (PHA, DIFCO, Detroit, MI, USA), soit d'anticorps antiCD3 (OKT3, Ortho, Raritan, NJ, USA) à 1 ug/ml.

2 - Anticorps et IL-2.

L'anticorps monoclonal TU27 est une IgG1 de souris dirigée contre la chaîne p75 du rIL-2 humain (19). Il a été purifié à partir de liquide d'ascite (fourni par K.Sugamura, Tohoku University, Japon) par chromatographie d'affinité sur une colonne de protéine A (Bio-Rad, Richmond, USA), dialysée contre du PBS, puis les échantillons ont été stockés à -20°C. L'anticorps TU27 a été déposé sous la référence FERM P 10509, FERM BP 2510 auprès de la collection japonaise : Fermentation Research Institute (FRI), 1-3, Higashi 1-chome, Yatabe-machi,

Tsukuba-gun, Ibaraki-ken 305 Japon.

L'anticorps monoclonâl 33B3.1 est une IgG2a de rat dirigée contre la chaîne p55 du rIL-2 humain (24, 25) et est commercialisé par IMMUNOTECH (France) sous la dénomination IOT 14a (Dépôt n° I-1002 auprès de la CNCM). L'anticorps Tic-1 est une IgG de souris dirigée contre la chaîne p75 du rIL2 humain. Il est vendu sous forme purifiée référence M-100A par les laboratoires Endogen (Boston, MA, USA).

L'anticorps A41 est une IgG1 de souris dirigée contre la chaîne p75 du rIL2 humain. Il a été fourni sous forme purifiée par U. Weidle des laboratoires Boehringer (Penzberg, Allemagne).

L'IL-2 utilisée est une molécule recombinante hautement purifiée produite dans Escherichia coli et a été fournie par les Laboratoires Roussel Uclaf, Romainville, France.

3 - Marquage radioactif de l'IL-2 et des anticorps monoclonaux.

L'IL-2 couplé à l'iode 125 provient de New England Nuclear (Boston, Massachusetts, USA). Sa radioactivité spécifique est comprise entre 300 et 1000 cpm/fmol. Tic-1, TU27, A41 et 33B3.1 ont été marqués à l'iode 125 par la méthode à l'iodogène (26). La radioactivité spécifique se situait entre 1500 et 2500 cpm/fmol.

4 - Essais de liaison.

Les cellules 4AS sont soumises au préalable à un "lavage" de l'IL-2 par préincubation pendant deux heures à 37°C dans un milieu exempt d'IL-2. Les cellules ont été ensuite centrifugées, lavées trois fois et remises en suspension dans du PBS contenant 0,5 % de BSA. Des échantillons de 25 µl par puits de suspension cellulaire

(entre 0,5 et 2.10^6 cellules par puits selon le cas) ont été répartis sur des plaques à 96 puits (NUNC, Roskilde, Danemark), avec des concentrations croissantes de ligand marqué dans un volume final de 50 µl par puits. Après une incubation de 45 mn (ligand = anticorps) ou de 30 mn (ligand = IL-2) à 37°C sous agitation, des cellules de chaque puits ont été déposées sur une couche d'huile de paraffine au dibutylphtalate, centrifugées et les fractions radioactives liées ou non liées aux cellules ont été séparées et comptées comme cela est décrit dans la référence 27. Les capacités de liaison maximales (Bmax) des ligands et leurs constantes de dissociation respectives (K_d) ont été déterminées par analyse Scatchard.

5 - Compétition.

Les cellules ont été préparées et réparties comme ci-dessus. Le ligand marqué a été ajouté à concentration fixe à des concentrations croissantes de compétiteurs non marqués. Après incubation à 37°C pendant 30 mn (IL-2) ou 45 mn (anticorps), les fractions liées et non liées aux cellules ont été déterminées comme cela a été décrit ci-dessus.

6 - Essai de prolifération.

Les cellules 4AS ont été réparties dans des plaques à 96 puits à raison d'une quantité de 10 000 cellules par puits dans 200 µl de milieu RPMI 1640 + 10 % de sérum humain. On a ajouté ensuite des cellules stimulantes (20 000 cellules DAB irradiées par puits) et diverses concentrations d'IL-2. Après 72 h d'incubation à 37°C en incubateur, les cellules ont été incubées pendant 16 h en présence de thymidine tritiée (0,25 µCi par puits) (Amersham, Les Ulis, France), récoltées (appareil de récolte PHD, Watertown, Massachusetts, USA) et

l'incorporation de thymidine a ensuite été déterminée.

Les PBL stimulés en PHA ou OKT3 ont été répartis dans des plaques à 96 puits dans les mêmes conditions que les 4AS. On a ajouté de l'IL2 à 250 pM et éventuellement les anticorps anti-rIL2 à différentes concentration. L'incorporation de thymidine est effectuée comme pour les cellules 4AS.

INTERACTION DE TU27 ET DE 33B3.1 AVEC LA LIAISON A HAUTE AFFINITE DE L'IL-2.

L'influence de TU27 et de 33B3.1 sur la liaison de l'IL-2 avec les cellules 4AS a été d'abord analysée à 37°C par addition des compétiteurs en même temps que l'IL-2 marquée (figures 1A. 1B). Dans le domaine des concentrations étudiées (jusqu'à 2 nM), la liaison de l'IL-2 est caractérisée par une prédominance de la composante à haute affinité (K_d = 60 pM, 2600 sites/cellule) et l'apparition d'une composante à faible affinité. A une concentration (26 nM) induisant une inhibition complète de la liaison de l'IL-2 sur des cellules YT.2C2 (clone dérivé d'une lignée cellulaire du type NK humain ; référence bibliographique 4) qui n'expriment que la chaîne p75, l'anticorps TU27 n'a que faiblement inhibé la liaison de l'IL-2 aux cellules 4AS et le K_d de la liaison à l'IL-2 n'a été que légèrement affecté (K_d = 75 pM) (figure 1B).

L'anticorps 33B3.1, qui est inactif vis-à-vis des cellules YT.2C2 du fait de l'absence de la chaîne p55, a présenté un effet inhibiteur bien supérieur à TU27 sur la liaison de l'IL-2 aux cellules 4AS. Comme cela ressort des analyses Scatchard (figure 1B), l'anticorps 33B3.1 induit la disparition complète de la composante à haute affinité. La liaison de l'IL-2 en présence de 33B3.1 s'est caractérisée par une affinité intermédiaire (K_d = 1,36 nM).

Le nombre de sites de liaison à affinité intermédiaire (2500 sites/cellule) était analogue au nombre de sites de liaison à haute affinité mesuré en l'absence de 33B3.1, suggérant que 33B3.1, en se fixant sur p55, a pour effet de transformer les structures à haute affinité par libération de la composante à affinité intermédiaire. En outre, les composantes à affinité intermédiaire observées en présence de 33B3.1 étaient complètement inhibées par TU27 (figures 1A, 1B) avec un effet demi-maximal observé au voisinage de 1 nM, montrant que cette composante correspondait bien à des chaînes p75 isolées.

On considère maintenant l'effet de l'IL-2 sur la liaison de TU27 (figure 2). L'IL-2 inhibe complètement la liaison de TU27 sur les cellules 4AS et cet effet a été observé à des concentrations faibles d'IL-2 (constante d'inhibition K_i = 20 pM) correspondant à sa liaison à haute affinité. Par lui-même, 33B3.1 n'a pas d'effet sur la liaison de TU27 et inversement. Par contre, en présence de 33B3.1, l'IL-2 n'inhibe la liaison de TU27 qu'à des concentrations environ 50 fois supérieures. Dans ce cas, la constante d'inhibition était de K_i = 890 pM.

Ces résultats confortent le schéma selon lequel l'anticorps 33B3.1, en se fixant aux chaînes p55, libère la composante à affinité intermédiaire pour l'IL-2 (p75).

EFFET DE TU27 ET DE 33B3.1 SUR LA PROLIFERATION IL-2-DEPENDANTE DES CELLULES 4AS

Stimulées par un allo-antigène (lignée cellulaire DAB), les cellules 4AS ont proliféré proportionnellement à la quantité d'IL-2 (figure 3). La prolifération demi-maximale a été observée pour 200 pM d'IL-2, une valeur correspondant à la liaison d'IL-2 au récepteur à haute

affinité.

L'ajout en excès de 33B3.1 (660 nM) dans le milieu de culture s'est traduit par une inhibition complète de la prolifération. En revanche, TU27 n'a pas eu d'effet significatif sur la prolifération IL-2-dépendante des cellules 4AS, même pour de faibles concentrations, sub-optimales, d'IL-2, que l'anticorps ait été ajouté en même temps que l'IL-2 ou qu'il ait été préincubé pendant 1 h avec les cellules, avant l'addition d'IL-2. Des expériences réalisées sur d'autres clones de cellules T ont donné des résultats similaires.

Les courbes de réponse en fonction des doses d'anticorps ont montré que 33B3.1 inhibait la prolifération induite par IL-2 des cellules 4AS (figure 4A) avec un effet demi-maximal observé à 7,5 nM. Une inhibition complète de la prolifération par 33B3.1 n'était observée qu'à concentration élevée (> 100 nM). Cependant, lorsque TU27 était présent à une concentration de 70 nM, la courbe de réponse en fonction de la dose de 33B3.1 était largement décalée vers les faibles concentrations. Dans ce cas, l'inhibition demi-maximale de la prolifération était obtenue avec seulement 0,2 nM de 33B3.1, c'est-à-dire environ 40 fois moins d'anticorps.

D'autres expériences (figure 4B) ont montré que, alors que TU27 seul à des concentrations importantes de 50 pM à 320 nM, avec ou sans préincubation, n'avait pas d'effet sur la prolifération induite par IL-2, cet anticorps montrait un effet inhibiteur en présence de 33B3.1. L'anticorps 33B3.1 à 25 nM induit une inhibition de 70 % environ de la prolifération et les 30 % restants sont complètement inhibés par TU27 (effet demi-maximum observé à 1 nM).

Des expériences de liaison réalisées sur une lignée cellulaire n'exprimant que la chaîne p75 humaine (lignée YT clone 2C2) (référence 4) ont montré que les anticorps Tic-1, TU27 et A41 reconnaissent une épitope commun sur la chaîne p75 avec des affinités respectives de l'ordre de 10 nM, 1 nM et 0.1 nM.

La figure 5A montre que l'effet inhibiteur du 33B3.1 sur la prolifération des cellules 4AS est d'autant plus efficace que lui est associé un anti-p75 de forte affinité. Dans cette expérience, le 33B3.1 utilisé seul bloque partiellement (30 %) la prolifération à la plus forte concentration (167 nM), avec un IC50 estimé à 1430 nM. En présence de 20 nM Tic-1, de 20 nM TU27 ou de 20 nM A41, l'IC50 du 33B3.1 chute respectivement à 102 nM, 2,3 nM ou 0,056 nM, c'est-à-dire à des concentrations respectivement 14 fois, 620 fois ou 25500 fois moins importantes qu'en l'absence de l'anti-p57 correspondant.

Inversement (Figure 5B), les anticorps anti-p75 n'entraînent que très peu d'inhibition de la prolifération des cellules 4AS en l'absence de 33B3.1. En présence de 10 nM de 33B3.1, dose à laquelle on n'observe aucune inhibition de la prolifération cellulaire, les anticorps anti-p75 inhibent complètement cette prolifération et les IC50 sont corrélés avec les affinités respectives des anti-p75 : IC50 de Tic-1 = 58 nM ; IC50 de TU27 = 4,5 nM ; IC59 de A41 = 0,85 nM.

Sur la figure 6 sont montrés les effets de synergie entre 33B3.1 et A41 dans différents modèles d'inhibition de la prolifération cellulaire IL2-dépendante. Sont comparés sur cette figure les cellules 4AS stimulées par les cellules DAB (système de stimulation secondaire allogénique d'un clone cellulaire T), des PBL stimulés par OKT3

(stimulation primaire via le complexe TCR/CD3 d'une population polyclonale) et des PBL stimulés par PHA (stimulation primaire par un mitogène d'une population polyclonale). Dans tous les cas, on observe que la dose-réponse d'inhibition par le 33B3.1 est déplacée vers des concentrations beaucoup plus faibles lorsqu'est rajouté l'anticorps A41 (20 nM) qui tout seul n'a que très peu d'effet quel que soit le système cellulaire étudié.

Les résultats présentés dans les figures 5 et 6 suggèrent que la propriété de synergie entre anti-p55 et anti-p75 est généralisable au moins à tout couple d'anticorps interagissant avec les épitopes définis respectivement sur les chaînes p55 et p75 par les anticorps 33B3.1 et Tic-1/TU27/A41. Ils montrent également que cette synergie est généralisable à tout système de prolifération passant par le système IL2/rIL2 de haute affinité (association p55 et p75).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1 - W.C. GREENE et al., 1985, J. Exp. Med. 162:363.

2 - M. SHARON et al., 1986, Science 234:859.

3 - M. TSUDO et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4215.

4 - K. TESHIGAWARA et al., 1987, J. Exp. Med. 165:223.

5 - R.J. ROBB et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2002.

6 - M. HATAKEYAMA et al., 1989, Science 244:551.

7 - T. NIKAIDO et al., 1984, Nature 311:631.

8 - H. M. WANG et al., 1987, J. Exp. Med. 166:1055.

9 - M. TSUDO et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5394.

10 - L. T. BICH-THUY et al., 1987, J. Immunol. 139:1550.

11 - R.J. ROBB et al., 1987, J. Exp. Med. 165:1201.

12 - N. S. HAYOSH et al., 1987, J. Immunol. 138:3771.

13 - V. E. KELLEY et al., 1988, J. Immunol. 140:59.

14 - T. A. WALDMANN et al., 1985, Cancer Res. 45:45595.

15 - J. P. SOULILLOU et al., 1989, Transplant. Int. 2:46.

16 - J. P. SOULILLOU et al., 1987, Lancet 1:1339.

17 - D. CANTAROVICH et al., 1988, Am. J. Kidney Dis. 11:101.

18 - D. CANTAROVICH et al., 1989, Transplant. Proc. 21:1769.

19 - T. TAKESHITA et al., 1989, J. Exp. Med. 169:1323.

20 - M. TSUDO et al. , 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1982.

21 - Y. NAKAMURA et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1318.

22 - J. F. MOREAU et al., 1986, J. Clin. Invest. 78:874.

23 - J. F. MOREAU et al., 1987, Transplant. Proc. 19:401.

24 - D. OLIVE et al., 1986, Eur. J. Immunol. 16:611.

25 - B. LE MAUFF et al., 1987, Hum. Immunol. 19:53.

26 - P. J. FRAKER et al., 1987, Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:849.

27 - Y. JACQUES et al., 1986, J. Immunol. 136:1693.

REVENDICATIONS.

1. Composition comprenant au moins deux anticorps dirigés contre le récepteur de l'interleukine-2, caractérisée en ce qu'elle comporte un anticorps anti-p55 et un anticorps anti-p75 assurant l'inhibition de la liaison de l'interleukine-2 à son récepteur.

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'anticorps anti-p55 et/ou l'anticorps anti-p75 sont des anticorps monoclonaux.

3. Composition selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle comporte l'anticorps 33B3.1 dirigé contre la chaîne p55 et l'anticorps TU27 ou l'anticorps Tic-1 ou l'anticorps A41 dirigés contre la chaîne p75.

4. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'un au moins des anticorps est un anticorps chimérique.

5. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que les deux anticorps sont liés sous forme d'anticorps bispécifique.

6. Composition selon la revendication 3, caractérisée en ce que le rapport de 33B3.1/TU27, le rapport de 33B3.1/Tic-1 ou le rapport de 33B3.1/A41 est compris entre 99/1 et 1/99.

7. Composition selon la revendication 3, caractérisée en ce que le rapport de 33B3.1 / TU27 est de 63 ± 20 / 37 ± 20, le rapport 33B3.1/Tic est de 20 ± 10/80 ± 10, le rapport 33B3.1/A41 est de 80 ± 10/20 ± 10.

8. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, comme agent actif contre les rejets d'organes et de greffes de moelle, contre les leucémies et lymphomes CD25-positifs ainsi que contre les pathologies

auto-immunes telles que le diabète de type 1, la polyarthrite rhumatoïde, la spondylarthrite ankylosante, la sclérose en plaques et la myasthénia gravis.

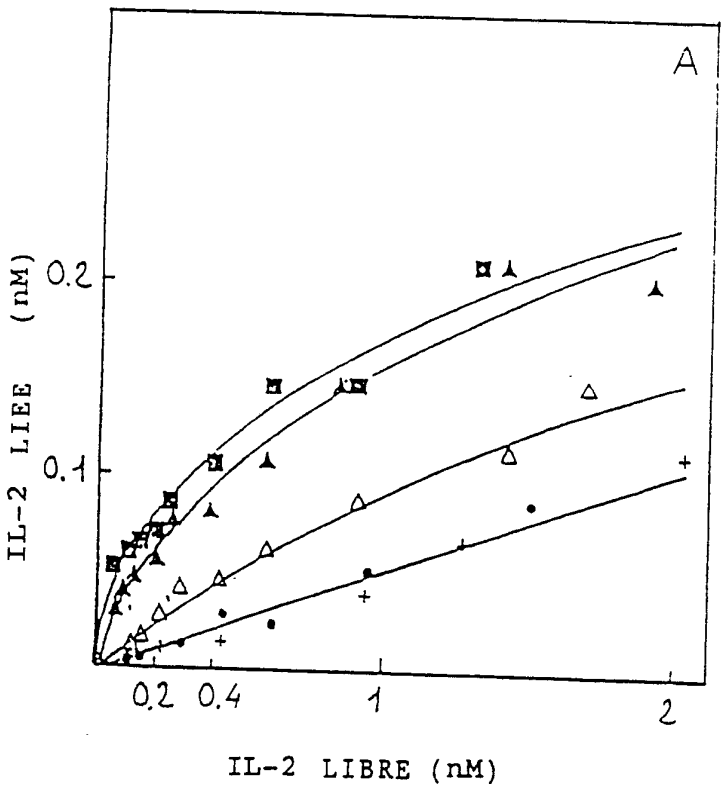

A
IL-2 LIEE (nM)
0.2
0.1
0.2
0.4
1
2
IL-2 LIBRE (nM)

FIG. 1A

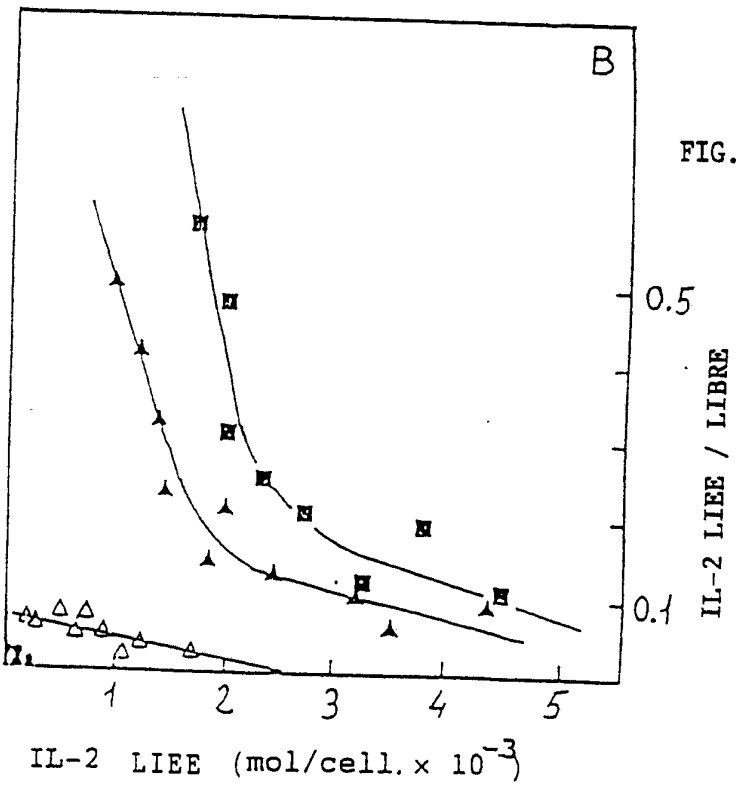

B
0.5
0.1
IL-2 LIEE / LIBRE
1
2
3
4
5
IL-2 LIEE (mol/cell. x 10^{-3})

FIG. 1B

FIG. 2

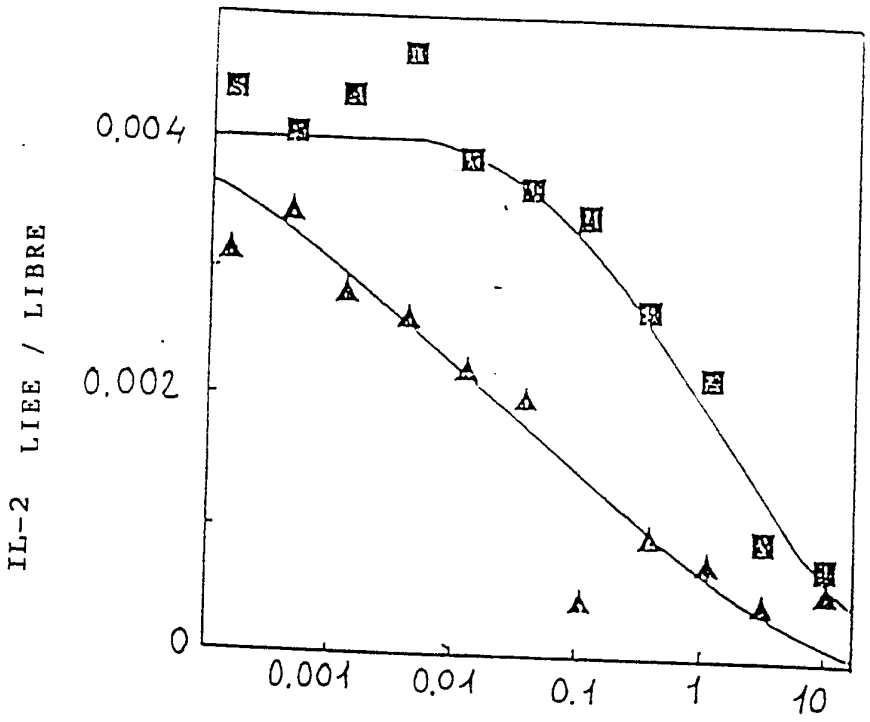


FIG. 3

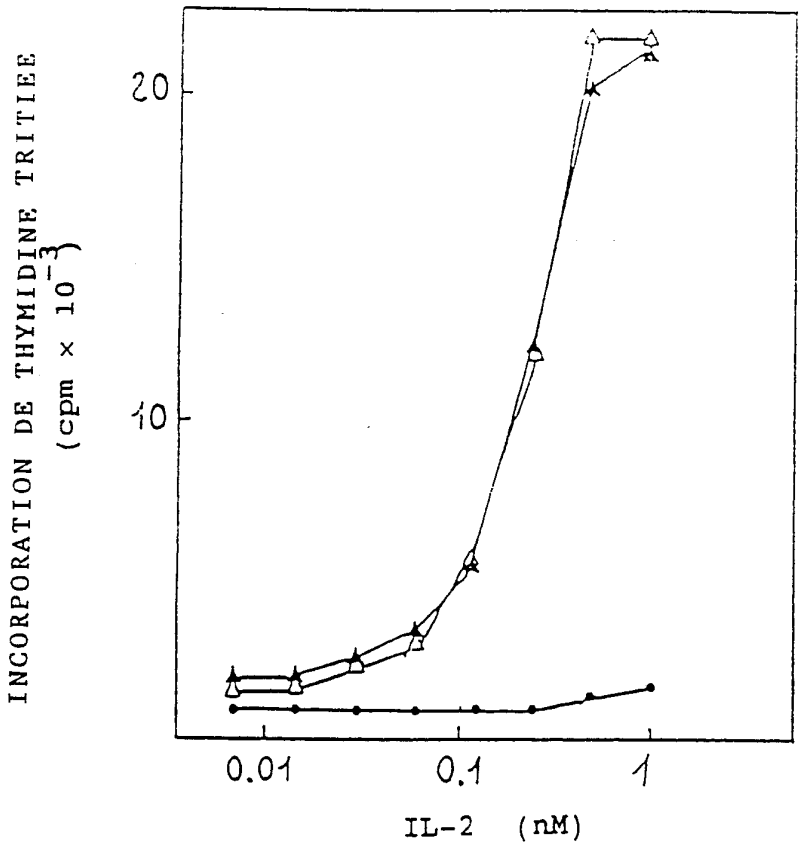

INCORPORATION DE THYMIDINE TRITIEE
(cpm x 10^{-3})
20
10
0.01
0.1
1
IL-2 (nM)

FIG. 4A

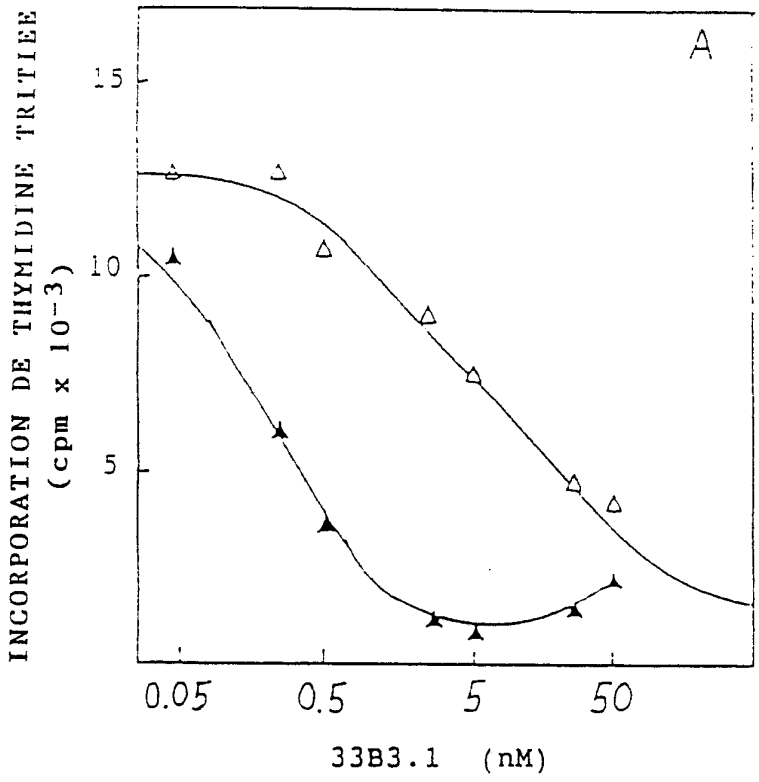

A
INCORPORATION DE THYMIDINE TRITIEE
(cpm x 10^{-3})
15
10
5
0.05
0.5
5
50
33B3.1 (nM)

FIG. 4B

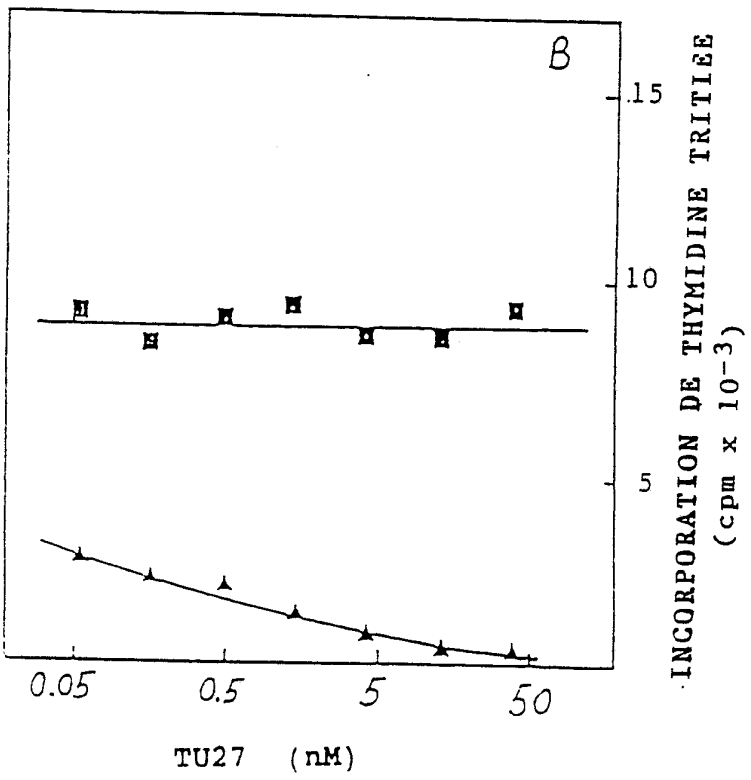

B
15
10
5
INCORPORATION DE THYMIDINE TRITIEE
(cpm x 10^{-3})
0.05
0.5
5
50
TU27 (nM)

FIG. 5A

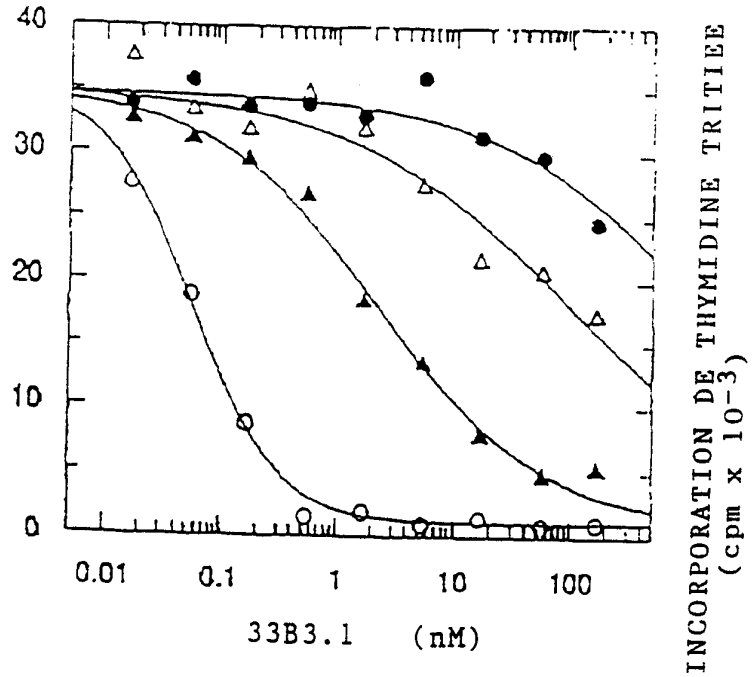

40
30
20
10
0
0.01
0.1
1
10
100
33B3.1 (nM)
INCORPORATION DE THYMIDINE TRITIEE
(cpm x 10-3)

FIG. 5B

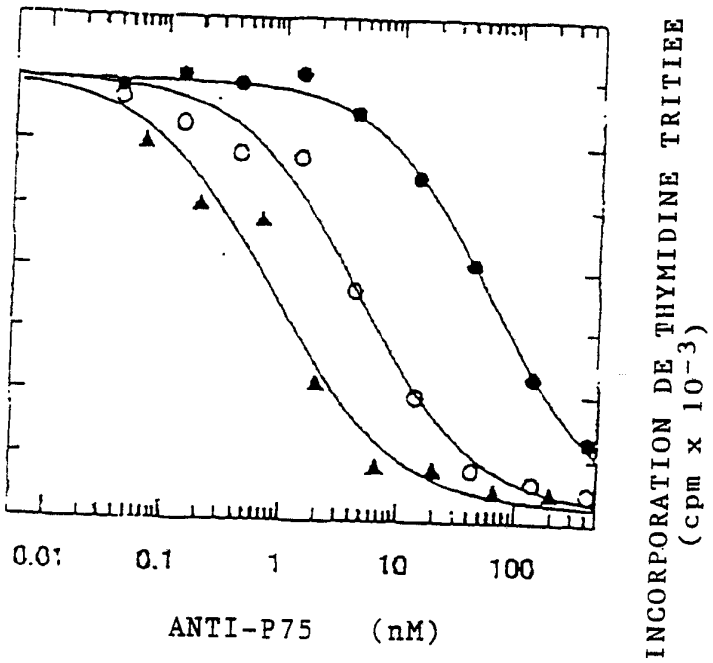
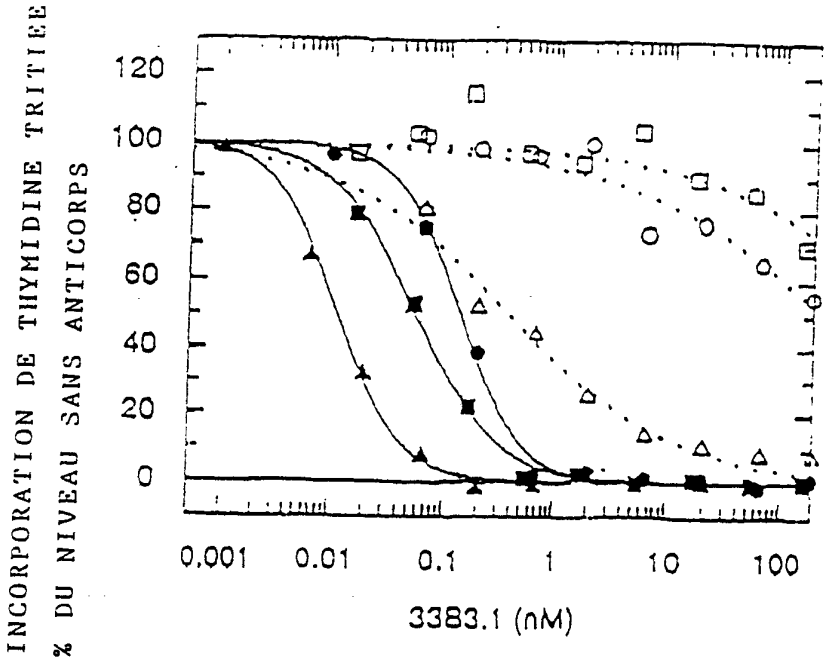

0.01
0.1
1
10
100
ANTI-P75 (nM)
INCORPORATION DE THYMIDINE TRITIEE
(cpm x 10-3)

FIG.6


INCORPORATION DE THYMIDINE TRITIEE
% DU NIVEAU SANS ANTICORPS
120
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
3383.1 (nM)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 92/00075

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) [6]

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int. Cl.[5] C07K15/00

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched [7]

Classification System	Classification Symbols
Int. Cl.[5]	C07K

Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are included in the Fields Searched [8]

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT [9]

Category *	Citation of Document, [11] with indication, where appropriate, of the relevant passages [12]	Relevant to Claim No. [13]
Y	EP,A,0 241 811 (BAYER) 21 October 1987 cited in the application see claim 1	1-8
Y	EP,A,0 296 082 (IMMUNOTECH) 21 December 1988 see page 2, line 23 - page 3, line 2	1-8
Y	PROC.NATL.ACAD.SCI.USA vol. 86, March 1989, pages 1982 - 1986; M.TSUDO: 'Characterization of the interleukin 2 receptor beta chain using three distinct monoclonal antibodies' cited in the application see page 1982: "abstract"	1-3

./.

* Special categories of cited documents: [10]

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report
12 May 1992 (12.05.92)	27 May 1992 (27.05.92)
International Searching Authority	**Signature of Authorized Officer**
EUROPEAN PATENT OFFICE	

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
Y	W.KNAPP 'LEUCOCYTE TYPING IV' 1989 , OXFORD UNIVERSITY PRESS , OXFORD & pages 408 - 411; A.M.RAVOET: 'CD25 mAb: epitopes recognized, effect on lymphocyte activation, mediation of ADCC'	1-3
A	PROC.NATL.ACAD.SCI.USA vol. 86, February 1989, pages 1318 - 1322; NAKAMURA ET AL.: 'Mitogenicity and down regulation of high-affinity interleukin 2 receptor by YTA-1 and YTA-2, monoclonal antibodies that recognize 75kda molecules on human large granular lymphocytes"' see page 1318, abstract	1-2

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. FR 9200075 SA 57190

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 12/05/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0241811	21-10-87	GB-A- 2188941	14-10-87
		JP-A- 63012297	19-01-88
EP-A-0296082	21-12-88	FR-A- 2616330	16-12-88
		WO-A- 8809671	15-12-88
		JP-T- 1503540	30-11-89

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No PCT/FR 92/00075

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) [7]

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

CIB 5 C07K15/00

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée[8]

Système de classification	Symboles de classification
CIB 5	C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté[9]

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS[10]

Catégorie °	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire,[12] des passages pertinents[13]	No. des revendications visées [14]
Y	EP,A,0 241 811 (BAYER) 21 Octobre 1987 cité dans la demande voir revendication 1	1-8
Y	EP,A,0 296 082 (IMMUNOTECH) 21 Décembre 1988 voir page 2, ligne 23 - page 3, ligne 2	1-8
Y	PROC.NATL.ACAD.SCI.USA vol. 86, Mars 1989, pages 1982 - 1986; M.TSUDO: 'Characterization of the interleukin 2 receptor beta chain using three distinct monoclonal antibodies' cité dans la demande voir page 1982: "abstract"	1-3

-/--

° Catégories spéciales de documents cités:[11]

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

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

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

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

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

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

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive

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

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

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
12 MAI 1992	27.05.92
Administration chargée de la recherche internationale	**Signature du fonctionnaire autorisé**
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	TURMO Y BLANCO C.

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (Janvier 1985)

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS [14] (SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)

Catégorie *	Identification des documents cités, [16] avec indication, si nécessaire des passages pertinents [17]	No. des revendications visées [18]
Y	W.KNAPP 'LEUCOCYTE TYPING IV' 1989 , OXFORD UNIVERSITY PRESS , OXFORD & pages 408 - 411; A.M.RAVOET: 'CD25 mAb: epitopes recognized, effect on lymphocyte activation, mediation of ADCC'	1-3
A	PROC.NATL.ACAD.SCI.USA vol. 86, Février 1989, pages 1318 - 1322; NAKAMURA ET AL.: 'Mitogenicity and down regulation of high-affinity interleukin 2 receptor by YTA-1 and YTA-2, monoclonal antibodies that recognize 75kda molecules on human large granular lymphocytes"' voir page 1318, résumé	1-2

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.

FR 9200075
SA 57190

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 12/05/92
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0241811	21-10-87	GB-A- 2188941	14-10-87
		JP-A- 63012297	19-01-88
EP-A-0296082	21-12-88	FR-A- 2616330	16-12-88
		WO-A- 8809671	15-12-88
		JP-T- 1503540	30-11-89

EPO FORM P0472