

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
6 mars 2003 (06.03.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 03/018048 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :

**A61K 38/17**, 48/00, 47/48,

A61P 35/00, 37/06 // A61K 49/14, 51/08

Toulouse (FR). **LE BOUTEILLER, Philippe** [FR/FR]; 4  
rue Toulouse-Lautrec, F-31700 Blagnac (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR02/02812

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

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

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

01/10554

7 août 2001 (07.08.2001) FR

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

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

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) :  
**ABTECH** [FR/FR]; 151 boulevard du Montparnasse,  
F-75006 Paris (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE -CNRS-** [FR/FR]; 3,  
rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). **INSERM**  
[FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13  
(FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **PLOUET,  
Jean** [FR/FR]; 29, rue Naulet, F-31400 Toulouse (FR).  
**FONS, Pierre** [FR/FR]; Résidence Bel Horizon, 17  
rue Julia, F-31500 Toulouse (FR). **L'FAQIHI, Fatima**  
[FR/FR]; 38 bis rue Louis Plana, Maison N°6, F-31500

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

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

(54) Title: USE OF HLA CLASS 1 SOLUBLE MOLECULES TO INHIBIT ANGIOGENESIS

(54) Titre : UTILISATION DE MOLECULES SOLUBLES HLA DE CLASSE 1 POUR INHIBER L'ANGIOGENESE

(57) Abstract: The invention relates to the use of a HLA class 1 soluble molecule or a nucleic acid molecule comprising a polynucleotide sequence that codes for a HLA class 1 molecule for the preparation of pharmaceutical compositions that are intended to inhibit angiogenesis or to detect angiogenic sites. More specifically, the invention relates to the use of HLA-G1 molecules or HLA-B7 molecules for the treatment of pathologies including cancer, diabetic retinopathies, rheumatoid polyarthritis, chronic rejection of transplants, such as cornea or kidney, or acute rejection observed in xenotransplantations, angiomas, angiosarcomas, in particular Castleman's disease or Kaposi's sarcoma.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet l'utilisation d'une molécule soluble HLA de classe 1 ou d'une molécule d'acide nucléique comprenant une séquence polynucléotidique codant pour une molécule soluble HLA de classe 1 pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à inhiber l'angiogénèse ou à détecter des sites angiogéniques. L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation des molécules HLA-G1s ou HLA-B7s pour le traitement de pathologies comprenant le cancer, les rétinopathies diabétiques, la polyarthrite rhumatoïde, le rejet chronique de greffes comme la cornée ou le rein ou le rejet aigu observé dans les xénotransplantations, les angiomes, les angiosarcomes, en particulier la maladie de Castelman ou le sarcome de Kaposi.



WO 03/018048 A1

UTILISATION DE MOLECULES SOLUBLES HLA DE CLASSE 1  
POUR INHIBER L'ANGIOGENESE

5           La présente invention se rapporte au domaine de  
l'inhibition de l'angiogénèse impliquée dans des nombreux  
syndromes prolifératifs pathologiques. L'invention se  
rapporte à l'utilisation de molécules solubles du Complexe  
Major d'Histocompatibilité (CMH) et tout particulièrement à  
10 l'utilisation de molécules solubles HLA de classe 1, comme  
HLA-Gs ou HLA-B7s, pour la préparation de compositions  
pharmaceutiques utiles pour inhiber l'angiogénèse, et donc  
destinées au traitement des pathologies angiogéniques  
impliquant des cellules endothéliales et en particulier  
15 pour enrayer leur prolifération tumorale. L'invention  
envisage également l'utilisation de ces molécules pour  
vectoriser des substances d'intérêt thérapeutique ou de  
diagnostic au niveau des cellules endothéliales impliquées  
dans un processus d'angiogénèse pathologique. L'invention  
20 se rapporte encore à la préparation d'anticorps dirigés  
contre ces molécules et aux compositions les contenant pour  
favoriser l'angiogénèse et traiter des pathologies  
nécessitant la prolifération des cellules endothéliales.

Les cellules endothéliales tapissent l'intérieur  
25 de tous les vaisseaux sanguins de l'organisme. Ces cellules  
ont un phénotype quiescent, elles ne prolifèrent quasiment  
pas, en effet seulement 0,01% des cellules endothéliales  
sont engagées dans la division cellulaire à un moment  
donné. Le rôle physiologique des cellules endothéliales est  
30 très vaste, elles participent à des nombreux phénomènes  
vitaux pour l'organisme : coagulation sanguine, maintien de  
la pression artérielle, recrutement de cellules  
circulantes, synthèse de facteurs de croissance.

Quand un territoire requiert un apport accru en  
35 oxygène et en nutriments il réagit en relarguant des

facteurs solubles qui convertissent le phénotype des cellules endothéliales en un phénotype activé, et des facteurs mitogènes pour les cellules endothéliales de phénotype activé. Ces cellules endothéliales acquièrent  
5 enfin un phénotype angiogénique et deviennent capables d'effectuer le programme d'angiogénèse, c'est-à-dire le développement de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau préexistant. Ce phénomène est normal et contrôlé lors d'une blessure ou dans la maturation du corps jaune de  
10 l'ovaire ; en revanche, il devient dangereux dans des situations pathologiques où l'angiogénèse n'est plus contrôlée, par exemple dans la rétinopathie diabétique, la polyarthrite et le développement tumoral.

15 Le gène HLA-G de classe Ib, localisé sur la même région chromosomique que les autres gènes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe Ia (HLA-A, -B et -C) est caractérisé par des propriétés structurales dont certaines semblent uniques (Le Bouteiller and Blaschitz,  
20 1999; Le Bouteiller et al., 1999). Quatre isoformes membranaires de HLA-G ont été décrites, elles sont dues à l'épissage alternatif d'un ou de deux exons codant pour les domaines externes de la molécule (Ishitani and Geraghty, 1992 ; Kirszenbaum et al., 1994). Seule l'isoforme longue  
25 contenant les trois domaines externes  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$ , semble avoir la capacité de s'exprimer de façon stable à la surface cellulaire (Mallet et al.,). Deux isoformes HLA-G solubles ont également été mises en évidence (Fujii et al., 1994), l'existence de telles isoformes étant due à la  
30 traduction de l'intron 4 et à la présence d'un codon stop à l'intérieur de cet intron, empêchant la traduction des domaines transmembranaires et cytoplasmiques.

L'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques  
35 de HLA-G a permis de mettre en évidence l'expression de

protéines HLA-G dans le placenta (Le Bouteiller and Blaschitz, 1999), le thymus (Mallet et al., 1999) et le sang périphérique (Puppo et al., 1999, Rebmann et al., 1999). La protéine HLA-G a été détectée dans différentes  
5 sous-populations cellulaires placentaires : le cytotrophoblaste extravilleux, certains macrophages présents dans les villosités chorioniques, et les cellules endothéliales des vaisseaux foetaux ainsi que les cellules de l'épithélium amniotique (Blaschitz et al., 1999 ; Hammer  
10 et al., 1997). Enfin, la protéine HLA-G soluble a été détectée dans le liquide amniotique ainsi que dans le sang périphérique de femmes enceintes (Fournel et al., 1999 ; Puppo et al., 1999 ; Rebmann et al., 1999 ; Fournel et al., 2000a).

15 La présence de HLA-G dans le placenta suggère que cette molécule pourrait exercer un rôle favorisant le maintien de la gestation en prévenant un rejet du fœtus par la mère (Le Bouteiller and Blaschitz, 1999; Le Bouteiller et al., 1999). La molécule HLA-G n'étant pas polymorphique,  
20 elle ne peut par elle-même entraîner de réaction alloimmune maternelle anti-paternelle. Par cette absence de polymorphisme, la molécule HLA-G peut reconnaître les cellules T activées, indépendamment du T cell Receptor, via les molécules CD8, et induire l'apoptose de ces cellules *in*  
25 *vitro* (Fournel et al. 2000b).

Les inventeurs se sont intéressés au mécanisme d'induction d'apoptose des cellules T CD8+ activées qui pourrait favoriser *in vivo* l'élimination locale dans la  
décidua, des cellules maternelles T CD8+ alloréactives.  
30 HLA-G soluble présent dans le sang maternel au cours de la gestation (Puppo et al., 1999 ; Rebmann et al., 1999) pourrait exercer le même effet et ainsi contribuer au maintien d'un état de tolérance envers HLA-G (Fournel et al., 2000b).

La molécule HLA-G membranaire, présente sur les cellules du cytotrophoblaste extravilleux, peut être reconnue par des récepteurs NK de type inhibiteur (Lanier, 1998). Une telle reconnaissance peut soit inhiber la lyse  
5 par les cellules déciduales NK de ces cellules trophoblastiques (Loke and King, 1995), soit induire la sécrétion de cytokines particulières favorisant la gestation (Maejima et al., 1997).

Il a aussi été envisagé que la molécule HLA-G  
10 soluble pourrait exercer un rôle modulateur de l'angiogenèse placentaire (Le Bouteiller and Blaschitz, 1999; Le Bouteiller et al., 1999). Ainsi, un certain nombre d'observations ont suggéré que cette molécule pourrait exercer une fonction stimulante pour les cellules  
15 endothéliales maternelles et/ou pour les cellules trophoblastiques :

- HLA-G a été détecté par immunohistochimie sur coupes de placentas dans certaines cellules endothéliales (Blaschitz et al., 1997) à l'aide de certains anticorps  
20 anti-HLA-G,

- l'expression placentaire de HLA-G est fortement diminuée, voire absente, dans les placentas pré-eclamptiques (Hara et al., 1996), pathologie associée à un défaut de vascularisation (Taylor, 1997),

- les cellules endothéliales tapissant les artères spiralées maternelles présentes dans la décidua sont progressivement éliminées et remplacées par les cellules trophoblastiques endovasculaires, qui elles-mêmes expriment HLA-G au cours de la placentation (Proll et al.,  
25 1999).

Les molécules HLA de classe I ont été décrites comme pouvant s'associer structurellement à certains récepteurs membranaires, y compris des récepteurs à l'insuline (Kittur et al., 1987) et récepteurs à EGF  
35 (Schreiber et al., 1984). Stagsted et al. (1990) avait

aussi démontré que des peptides dérivés de molécules HLA de classe I pouvaient réguler la fonction des récepteurs à l'insuline. Cependant, à ce jour aucune description d'un quelconque rôle non immunologique de la forme soluble de HLA G1 n'a été rapporté et il n'existe non plus de données expérimentales démontrant la présence de récepteurs au HLA-Gs sur les cellules endothéliales. Aucun effet biologique du HLA-Gs sur ces cellules ou dans l'angiogénèse n'a été décrit.

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de la présente invention ont maintenant permis de mettre en évidence les effets de la molécule HLA-G soluble (HLA-Gs) sur la différenciation des cellules endothéliales et de comprendre certains aspects de son mécanisme d'action.

Il a ainsi été identifié des nouvelles fonctions, non-immunologiques, de la molécule soluble HLA-G1s exercée sur des cellules endothéliales. Les inventeurs ont en effet démontré que des molécules HLA-G1s non classiques inhibent la prolifération, la migration des cellules endothéliales et la translocation à la surface membranaire des cellules endothéliales d'une molécule de reconnaissance des lymphocytes, l'ICAM-1. Il a notamment été montré que les molécules HLA-G et HLA-B7 solubles, aussi désignées HLA-Gs et HLA-B7s, sont capables d'inhiber la progression tumorale de xénogreffes de cellules d'adénocarcinome de la prostate humaine greffée chez la souris nude immunodéprimée. Plus particulièrement, la molécule HLA-G1s exerce cet effet anti-prolifératif sur des cellules endothéliales provenant de différentes espèces (Homme, bœuf, porc), ce qui suggère une fonction importante conservée chez différentes espèces de mammifères.

La présente invention a donc pour objet l'utilisation d'une molécule soluble HLA de classe I ou d'une molécule d'acide nucléique comprenant une séquence polynucléotidique codant pour une molécule soluble HLA de

classe 1 pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à inhiber l'angiogénèse ou à détecter des sites angiogéniques. En effet, les travaux de recherche réalisés dans le cadre de l'invention, ont permis  
5 de montrer que les molécules solubles HLA de classe 1 sont capables d'inhiber ou de stimuler l'activité des récepteurs au VEGF.

L'invention vise plus particulièrement les molécules HLA-G1s ou HLA-B7s, et les séquences  
10 polynucléotidiques codant pour celles-ci.

Il est connu que la molécule HLA-Gs est une molécule non polymorphique, à l'inverse des molécules HLA de classe Ia, dites classiques, qui, elles, sont extrêmement polymorphiques et peuvent donc induire une  
15 alloréaction si elles sont injectées à des individus non HLA identiques. Ces caractéristiques de la molécule HLA-Gs la rendent particulièrement utile pour son utilisation dans le cadre de pathologies angiogéniques impliquant des anomalies de prolifération des cellules endothéliales.

20 Toutefois, comme indiqué précédemment, deux isoformes HLA-G solubles ont également été mises en évidence, de telles isoformes constituent des molécules fonctionnellement équivalentes.

Ainsi, l'invention concerne des dérivés des  
25 molécules soluble HLA de classe 1 présentant des propriétés anti-angiogéniques que l'homme du métier est à même de tester à partir des méthodes rapportées dans la partie expérimentale ci-après. Il peut s'agir de fragments, de forme tronquée, de séquences modifiées par délétion,  
30 addition ou suppression d'un ou plusieurs acides aminés. De même l'invention se rapporte à des séquences polynucléotidiques codant pour lesdits dérivés.

Ces dérivés constituent des équivalents fonctionnels des molécules de l'invention que l'homme du  
35 métier est capable de préparer et de tester à partir de

l'enseignement de la présente invention et de ses connaissances générales. Par contre, la présente invention ne concerne pas les anticorps anti-idiotypes des molécules soluble HLA de classe 1 ou de leurs dérivés.

5

L'invention envisage à titre de substance actives utiles selon la présente invention, une molécule d'acide nucléique comprenant une séquence polynucléotidique codant une molécule soluble HLA de classe 1, ladite séquence étant placée sous le contrôle de séquences de régulation de son expression. Une telle molécule d'acide nucléique est un vecteur, comme par exemple un plasmide, un virus recombinant, une cellule transfectée par un vecteur d'expression plasmidique ou viral.

15 Une telle molécule d'acide nucléique peut être utilisée dans des protocoles de thérapie génique ou de thérapie cellulaires consistant à administrer ladite molécule ou des cellules transformées par ladite molécule à un individu de façon à exprimer une molécule soluble HLA de classe 1 et ainsi inhiber l'angiogénèse.

Les molécules solubles HLA de classe 1, et plus particulièrement celles décrites ci-dessus, sont particulièrement utiles pour traiter les pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse. Ainsi, ces molécules sont particulièrement adaptées pour la préparation de médicaments capables de prévenir ou d'inhiber l'angiogénèse et donc la prolifération des cellules endothéliales.

30 La molécule soluble HLA de classe 1 est associée dans les compositions selon l'invention avec tout véhicule pharmaceutiquement acceptable connu de l'homme du métier adapté au mode d'administration utilisé. Ainsi, les compositions selon l'invention peuvent être administrées par voie systémique ou injection locale

35

Elles comprennent une quantité adéquate d'agents actifs constitués d'au moins une molécule soluble HLA de classe I.

A titre d'exemple de pathologies dont le traitement nécessite de prévenir ou d'inhiber l'angiogénèse, on peut citer le cancer, les rétinopathies diabétiques, la polyarthrite rhumatoïde, le rejet chronique de greffes comme la cornée ou le rein ou le rejet aigu observé dans les xénotransplantations, les angiomes, les angiosarcomes, en particulier la maladie de Castelman ou le sarcome de Kaposi.

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de la présente invention ont permis de mettre en évidence l'existence de récepteurs de la molécule HLA-G1s à la surface des cellules endothéliales. L'invention a donc aussi pour objet toutes molécules autres qu'un anticorps anti-idiotype capables de se fixer à la surface des cellules endothéliales grâce à ce récepteur. L'existence d'un tel récepteur permet aussi d'utiliser la molécule HLA-G1s, ou ces dérivés, pour vectoriser des substances d'intérêt au niveau de sites angiogéniques. L'invention a donc pour objet l'utilisation de la molécule HLA-G1s seule ou associée à une substance d'intérêt pour la préparation d'une composition destinée à inhiber l'angiogénèse ou à détecter des sites angiogéniques. Comme indiqué précédemment, il peut s'agir de la molécule HLA-G1s ou d'un dérivé de celle-ci.

La substance d'intérêt peut être une substance chimique ou biologique active comme un médicament. On peut citer à titre d'exemple de tels médicaments : un anticorps anti-VEGF, un anticorps anti-VEGF R2, une toxine animale ou végétale, un composé radioactif, une drogue cytostatique ou cytolytique, un gène suicide ou une anti-sens.

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

5 L'invention concerne donc un composé constitué de la molécule HLA-G1s, ou d'un dérivé de celle-ci, couplé à une substance d'intérêt comme défini ci-dessus, ledit composé étant capable de se fixer aux cellules endothéliales par l'intermédiaire d'un récepteur. Ces  
10 composés de l'invention constituent donc un système de vectorisation de substances d'intérêt au niveau des cellules endothéliales impliquées dans des phénomènes angiogéniques particulièrement utiles pour traiter ou détecter les pathologies indiquées précédemment.

15 Le couplage de la molécule HLA-G1s, ou d'un équivalent fonctionnel de celle-ci, avec la substance d'intérêt peut être réalisé par tout moyen de liaison clivable ou non clivable dans un milieu biologique comme par exemple :

20 - un couplage par liaison covalente  
- une réaction d'oxydation aboutissant à la substitution d'un atome d'hydrogène par un atome d'iode sur un noyau indole

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

L'invention a encore pour objet l'utilisation d'anticorps dirigé contre les molécules solubles HLA de classe 1 pour la préparation d'une composition  
30 pharmaceutique utile pour stimuler la prolifération des cellules endothéliales. Ces compositions selon l'invention sont particulièrement utiles pour le traitement de pathologies impliquant un excès de la prolifération des cellules endothéliales et nécessitant une inhibition de  
35 leur croissance. A titre d'exemple de pathologies dont le

traitement nécessite la stimulation de l'angiogénèse, et une prolifération endothéliale, on peut citer la cicatrisation, la maturation du corps jaune de l'ovaire, la reperfusion des territoires ischémiés lors de thromboses vasculaires comme dans l'artérite des membres inférieurs et l'infarctus du myocarde.

Les anticorps entrant dans ces compositions de l'invention peuvent être monoclonaux ou polyclonaux et préparés selon les techniques bien connues de l'homme du métier à par des molécules solubles HLA de classe ou un équivalent fonctionnel de celles-ci.

Les molécules solubles HLA de classe 1 mise en œuvre dans le cadre de l'invention peuvent être préparées par des techniques classiques de purification comme décrites dans la partie expérimentale ci-après, mais aussi par génie génétique. Ainsi, les inventeurs ont produit la molécule HLA-G1s dans un système eucaryote humain, en particulier à partir de cellules humaines d'origine trophoblastique (lignée JAR, Fournel et al., 1999). Bien que les quantités de HLA-G1s produites par ce système restent limitées et que leur obtention s'effectue sur une durée relativement longue, les avantages de ce système de production sont les suivants : (i), la  $\beta 2m$  humaine est présente dans ces cellules et s'associe donc de façon non covalente naturelle à la chaîne lourde HLA-G1s ; (ii), les peptides qui se fixent dans la poche à peptides formée par les domaines externes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  de HLA-G sont très probablement identiques à ceux présents in vivo sur les molécules HLA-G1 secrétées par les cellules du cytotrophoblaste extravilleux pendant la gestation et qui doivent moduler l'angiogénèse placentaire au niveau de la décidua ; (iii), la molécule HLA-G1s ainsi produite est naturellement glycosylée alors qu'elle ne le serait pas si

un système procaryote ou cellules d'insectes avait été utilisé.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent rapportant les travaux qui ont conduit à l'identification du rôle des molécules HLA-Gs dans le processus de différenciation des cellules épithéliales. Il sera fait référence aux dessins en annexe dans lesquels :

10 - La Figure 1 rapporte les résultats de l'étude de liaison des facteurs aux récepteurs par un immunoessai par compétition.

- La figure 2 montre l'effet du temps d'incubation de HLA-Gs sur la phosphorylation de PLC- $\gamma$ .

15 - La figure 3 montre l'effet de HLAGs sur la phosphorylation de PI3K.

- La figure 4 montre l'effet de HLAGs sur la phosphorylation de MAPK 42/44.

20 - La figure 5 illustre les effets inhibiteurs de la molécule de HLA-Gs sur la prolifération des cellules endothéliales en présence de VEGF.

- La figure 6 illustre les effets de modulation de l'expression de ICAM-1 sur cellules HUVEC par cytométrie en flux.

25 - La figure 7 montre les résultats des tests d'inhibition de l'action anti-chimiotactique de HLA GS ou HLA B7 par l'anticorps W6/32.

30 - La figure 8 montre les effets des molécules HLA-Gs sur la croissance tumorale des cellules PC3 transfectées avec HLA-Gs.

- La figure 9 montre les résultats des tests d'inhibition de l'action de HLA GS sur la migration des cellules endothéliales par l'anticorps CL1-R2.

35 I - Matériel et méthode.

1) Purification de la molécule HLA-G1 soluble (HLA-G1s).

La molécule HLA-G1 soluble (HLA-G1s) a été purifiée dans le laboratoire INSERM U 395 à partir de surnageants de culture de cellules eucaryotes humaines HLA négatives, exprimant la  $\beta$ 2-microglobuline ( $\beta$ 2m), et transfectées (transfections stables) par du cDNA codant pour la chaîne lourde HLA-G1s (contenant l'intron 4) : cellules JAR d'origine trophoblastique ou cellules .221 d'origine lymphoïde. Les étapes de purification sont les suivantes (Fournel et al., 1999):

- Passage des surnageants de culture sur colonnes d'immunoaffinité (anticorps W6/32 reconnaissant les chaînes lourdes HLA de classe I, y compris HLA-G, associées à la  $\beta$ 2m). Les molécules HLA-G1s fixées sur la colonne sont ensuite éluées avec un tampon glycine à pH basique et neutralisées.

- La présence des molécules HLA-G1s dans les fractions d'éluion est évaluée par Elisa (Fournel et al., 2000a). Les fractions positives en Elisa sont poolées, concentrées et analysées par SDS-PAGE ou western blots à l'aide d'anticorps anti-HLA-G.

- La pureté de ces fractions est attestée par la présence d'une seule bande (37kDa) en western blot avec un anticorps spécifique de HLA-G et de deux bandes de 37- et de 12-kDa en SDS-PAGE, correspondant aux chaînes lourdes HLA-G et légère  $\beta$ 2m, respectivement (Fournel et al., 1999). L'expression de HLA-Gs dans le milieu conditionné de clones de cellules PC3 transfectées par pcDNA1/HLA-Gs ou pcDNA1 est mesurée par la même technique ELISA.

2) Facteurs de croissance utilisés.

Le VEGF (isoforme de 165 acides aminés) (Hutchings, 2000) est produit dans le laboratoire GDR 1927 par infection de cellules d'insecte SF9 par un baculovirus

recombinant contenant le cDNA correspondant (Plouët et al., 1997). L'iodation de VEGF et de HLA-Gs est effectuée selon la technique décrite précédemment.

Le dosage du VEGF dans les milieux conditionnés  
5 de cellules PC3 est effectué par radiorécepteur essai selon la technique décrite précédemment (Plouët, 1990).

### 3) Anticorps utilisés.

Les anticorps utilisés sont les suivants :

- anticorps de souris anti Plc gamma-1 (Upstate  
10 Biotechnology, cat 06-163)
- anticorps de souris anti P-tyr (Santa Cruz  
Biotechnology PY20 cat sc-508)
- anticorps de lapin anti PI3K (Upstate  
Biotechnology, p85 cat 06-195)
- 15 - anticorps de lapin anti-p erk 1/2 (New England  
Biolabs, cat 9101S)
- anticorps de lapin anti erk 2 (Santa Cruz  
Biotechnology c-14 cat sc-154)
- anticorps de souris anti-ICAM-1 (R&D systems  
20 CD54 cat BBA 3)

### 4) Cellules utilisées.

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

25 Les cellules endothéliales de veines de cordon ombilical humain (HUVEC) sont cultivées sur plastique recouvert de gélatine diluée à 0.2% dans du PBS. Les cellules sont cultivées en milieu endothélial SFM supplémenté par 50 unités/ml de pénicilline, 50 µg/ml de  
30 streptomycine, et 20% de sérum de veau fœtal et maintenues dans une étuve à 10 % CO2. Ces cultures sont entretenues avec du VEGF à 2 ng/ml ajouté au milieu tous les deux jours. (Plouët, 1997)

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

diluée à 0.2% dans du PBS. Les cellules sont cultivées en milieu DMEM-glutamax supplémenté par 50 unités/ml de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine, et 10% de sérum de veau nouveau-né et maintenues dans une étuve à 10 % CO<sub>2</sub>.

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

5) Cytométrie en flux.

Des HUVEC sont mises en présence des modulateurs  
10 durant 2 heures à 37°C en milieu sans sérum puis collectées par grattage et lavées 2 fois avec du PBS-BSA 0.2 %. 500 000 cellules sont incubées avec 1 µg d'anticorps anti-ICAM-1 dans un volume final de 50 µl. Les cellules sont alors incubées pendant 2 heures à 4°C, puis lavées 2 fois avec du  
15 PBS-BSA 0.2%. L'anticorps anti Fc de souris couplé au FITC est ensuite incubé pendant 1 heure. 2 lavages en PBS-BSA 0.2% sont de nouveau réalisés puis les cellules sont analysés par cytométrie en flux (FACSCAN, BECTON DICKINSON, Longueur d'onde 488 nm).

20 6) Expériences de liaison du HLA-Gs a ses récepteurs cellulaires.

Des cellules HUVEC sont cultivées dans des plaques de 12 puits jusqu'à la subconfluence. Les plaques de cellules sont déposées sur de la glace et lavées trois  
25 fois avec du "binding buffer" (DMEM tamponné à pH 7, 38 mM de l'HEPES 20 mM, supplémenté de 0,2 % de gélatine). Elles sont ensuite incubées pendant 3 heures à 4°C avec une 1 ng/ml de VEGF ou de HLA-Gs iodé dans un volume final de 500µl. La liaison non spécifique du ligand iodé aux  
30 cellules est déterminée en présence d'un excès de VEGF ou HLA-Gs non iodé. Après l'incubation, les cellules sont lavées trois fois dans du "binding buffer" et puis lysées avec 500 µl de NaOH 0,5M. La radioactivité retenue sur les cellules est mesurée au compteur gamma (Jonca,1997).

35 7) Phosphorylations.

Trois millions de cellules HUVEC préalablement déprivées en sérum sont incubées avec du HLA-Gs en présence ou absence de VEGF durant la période indiquée dans la figure) puis lavées 2 fois avec du PBS supplémenté d'inhibiteurs de phosphatases (1mM d'orthovanadate de sodium et de pyrophosphate de sodium) et d'inhibiteurs de protéases (2 µg/ml de chacun des inhibiteurs aprotinine, leupeptine, pepstatine, benzamidine et 0,5M d'EDTA). Les culots cellulaires sont alors lysés dans un tampon RIPA (0,1% SDS, 1% cacodylate, 1 mM EDTA, dans 10 mM de tampon phosphate, pH 7,4, supplémenté d'inhibiteurs de phosphatases et de protéases). Les lysats sont clarifiés par centrifugation puis le surnageant est préadsorbé sur des billes de protéine A sépharose (Pharmacia) 1 heure à 4°C. Après une centrifugation douce, le surnageant est incubé deux heures à 4°C avec 2 µg/ml de chacun des anticorps désignés dans la légende de la figure. Les complexes immuns sont adsorbés sur des billes de protéine A sépharose, lavés trois fois dans du tampon de lyse et élués dans du tampon d'échantillon SDS-PAGE. Les protéines éluées sont analysées sur un gel 8% (PLC gamma, PI3 kinase) ou 10% (MAP kinase) de polyacrylamide. Le gel est électrotransféré sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est ensuite hybridée avec l'anticorps anti phosphotyrosine PY 20 (Santa Cruz Biotechnology PY20 cat sc-508) dilué au 1/200<sup>ème</sup> puis avec un anticorps secondaire anti immunoglobulines de souris (1/10000) couplé à la peroxydase (Amersham Life Science). La révélation de l'activité enzymatique se fait par chemiluminescence avec un kit ECL (Amersham Life Science) (Ortégua, 1997).

#### 8) Mitogénicité.

Les cellules FBAE ou HUVECs sont ensemencées à faible densité (1000 cellules/cm<sup>2</sup>) dans des boîtes de 12 puits dont la surface a été préalablement tapissée de gélatine (Plouët, 1989). Les modulateurs sont ajoutés après

adhésion des cellules au plastique de culture, et après 2 jours. Chaque condition est étudiée dans trois puits différents. Les cellules sont trypsinisées et comptés au cinquième jour. Le pourcentage d'inhibition est calculé  
5 comme le rapport (Ortége, 1997) :

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

9) Croissance tumorale.

10 Les cellules PC3 dérivées d'adénocarcinome prostatique ont été transfectées par le vecteur PCDNA contenant la séquence codante de HLA-Gs (Fournel et al., 1999) ou non (vecteur vide) par l'utilisation de lipofectamine précédemment décrite (Plouët, 1997). Les  
15 cellules ayant intégré l'ADNc de résistance à la généticine sont sélectionnées par 600 mg/ml de G418 ajoutés au milieu de culture. Les clones de cellules ont été prélevés par aspiration à l'aide d'une micropipette sous contrôle microscopique. Les cellules des foyers prélevés sont alors  
20 cultivées et divisées en plusieurs cultures. Chacun des clones cellulaires est incubé avec du milieu RPMI contenant 5 mg/ml d'insuline et de transferrine pendant 48 h et les facteurs HLA-Gs et VEGF dosés. Le screening des clones positifs sécrétant HLA-Gs a été effectué par Elisa et  
25 cytométrie de flux intracellulaire à l'aide d'un panel d'anticorps anti-HLA-G spécifiques (Fournel et al., 2000a).

Les cellules PC3-3 et PC3/Gs11, PC3/Gs15 et PC3/Gs16 sont décollées des plastiques de culture à l'aide de trypsine-EDTA, homogénéisées, centrifugées et mis en  
30 suspension dans du milieu de culture additionné de 10% de sérum de veau fœtal. 1ml correspondant à 3,5 millions de cellules, est injecté sous la peau du flanc droit de chaque souris. La viabilité de la suspension est vérifiée au préalable par coloration vitale au bleu trypan ; le  
35 colorant est exclu de plus de 99% des cellules. 6 groupes

de 7 souris nude femelles âgées de 6 semaines ont été implantées.

Vingt jours plus tard, les mesures des tumeurs sont effectuées dans chaque groupe 2 fois par semaine par un opérateur ignorant l'allocation des souris dans chacun des 7 groupes.

Au terme de ces études chez la souris nude, les animaux sont sacrifiés. Les tumeurs et certains organes sains (rein, foie, vessie) sont prélevés et conservés pour moitié dans du liquide de conservation (FAE: Formol 4%, Ethanol 40%, Acide Acétique 10%, H2O qsp 100%) et pour moitié sont congelés par immersion dans l'azote liquide après protection par l'iso-thiopentane.

## 15 II - Résultats.

La figure 1 illustre les résultats de l'étude de liaison des facteurs aux récepteurs par un immunoessai par compétition, dans lequel, des cellules HUVEC subconfluentes sont incubées en tampon de liaison à 4°C avec 1 ng/ml de facteurs iodés ainsi qu'avec les facteurs non iodés. Après 4 heures, les cellules sont lavées 2 fois en PBS à 4°C. Les cellules sont lysées en 0,2M NaOH et la radioactivité liée est mesurée dans un compteur gamma.

La figure 2 montre l'effet du temps d'incubation de HLA-Gs sur la phosphorylation de PLC- $\gamma$ . Six millions HUVEC sont déprivées en sérum pendant 24 heures. Le HLA-Gs est ajouté pendant 10 ou 60 minutes. 120 ng/ml de VEGF est alors ajouté ou non pendant 15 minutes. Les cellules sont lavées 2 fois à 4°C avec du PBS en présence d'inhibiteurs de protéases et d'inhibiteurs de phosphatases. Les cellules sont collectées par grattage dans 5 ml de PBS et centrifugées à 400 g. Les culots cellulaires sont lysés dans un tampon RIPA à 4°C, préadsorbés sur des billes de

protéine A sépharose 1 heure puis incubés deux heures à 4°C avec 2 µg/ml d'anticorps anti-PLC-γ. Les complexes immuns sont adsorbés sur des billes de protéine A sépharose et lavés trois fois dans du tampon de lyse. Les surnageants  
5 sont élués, dénaturés et réduits dans du tampon échantillon contenant 50 mM de bêta-mercaptoéthanol puis analysés sur un gel 8 % de polyacrylamide. Le gel est électrotransféré sur une membrane de nitrocellulose qui est ensuite déshydratée puis hybridée avec un anticorps monoclonal anti  
10 P-tyr puis révélée avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. La révélation de l'activité enzymatique se fait par chimioluminescence avec un kit ECL

La figure 3 montre l'effet de HLAGs sur la  
15 phosphorylation de PI3K. Six millions HUVEC sont déprivées en sérum pendant 24 heures. Le HLA-Gs est ajouté pendant 10 ou 60 minutes. 120 ng/ml de VEGF est alors ajouté ou non pendant 15 minutes. Les cellules sont lavées 2 fois à 4°C avec du PBS en présence d'inhibiteurs de protéases et  
20 d'inhibiteurs de phosphatases. Les cellules sont collectées par grattage dans 5 ml de PBS et centrifugées à 400 g. Les culots cellulaires sont lysés dans un tampon RIPA à 4°C puis dénaturés et réduits dans du tampon d'échantillon contenant 50 mM de bêta-mercaptoéthanol et analysés sur un  
25 gel 8 % de polyacrylamide. Le gel est électrotransféré sur une membrane de nitrocellulose qui est ensuite déshydratée puis hybridée avec un anticorps anti PI3 K puis révélée avec un anticorps secondaire anti IgG de lapin couplé à la peroxydase. La révélation de l'activité enzymatique se fait  
30 par chimioluminescence avec un kit ECL. La membrane est ensuite déshybridée et ré-hybridée avec un anticorps polyclonal dirigé contre PI3 K.

La figure 4 montre l'effet de HLAGs sur la  
35 phosphorylation de MAPK 42/44. Un million HUVEC sont

déprivées en sérum pendant 24 heures. Le HLA-Gs est ajouté pendant 10 ou 60 minutes. 120 ng/ml de VEGF est alors ajouté ou non pendant 15 minutes. Les cellules sont lavées 2 fois à 4°C avec du PBS en présence d'inhibiteurs de protéases et d'inhibiteurs de phosphatases. Les cellules sont collectées par grattage dans 5 ml de PBS et centrifugées à 400 g. Les culots cellulaires sont lysés dans un tampon RIPA à 4°C puis dénaturés et réduits dans du tampon d'échantillon contenant 50 mM de bêta-mercaptoéthanol et analysés sur un gel 8 % de polyacrylamide. Le gel est électrotransféré sur une membrane de nitrocellulose qui est ensuite déshydratée puis hybridée avec un anticorps anti p erk1/2 puis révélée avec un anticorps secondaire anti IgG de lapin couplé à la peroxydase. La révélation de l'activité enzymatique se fait par chimioluminescence avec un kit ECL. La membrane est ensuite déshybridée et ré-hybridée avec un anticorps polyclonal dirigé contre erk 2.

La figure 5 illustre les effets inhibiteurs de la molécule de HLA-Gs sur la prolifération des cellules endothéliales en présence de VEGF. Les cellules FBAE sont ensemencées à faible densité (5000 cellules/puits) dans des boîtes de 12 puits. Des doses variables de HLA Gs ou HLA B7 sont ajoutées en présence ou absence de 2 ng/ml de VEGF après adhésion des cellules le premier et le troisième jour. Au cinquième jour, les cellules sont trypsinisées et comptées. Chaque puits est réalisé en triple. Le pourcentage d'inhibition est calculé comme décrit dans le texte.

Cette expérience met en évidence que HLAGs et HLA B7 inhibent l'effet mitogène du VEGF sur un mode dépendant de la dose ( $IC_{50} = 1$  nM). En revanche la protéine de fusion HLA-Gs avec la b2 microglobuline (HLA-Gs monocaténaire) n'a

pas d'effet sur la prolifération. Des résultats similaires ont été observés en utilisant des cellules HUVEC.

Il a été suggéré (Bian, 98) que la dimérisation de molécules HLA de classe I transmembranaires induite par la ligation à l'aide de l'anticorps W6/32 stimulait la prolifération des cellules musculaires lisses. Pour déterminer si cette ligation existait aussi dans les cellules endothéliales, les cellules HUVEC ont été soumises à l'action de l'anticorps W6/32 en présence ou absence de HLA Gs ou HLA B7s. Il apparaît que W6/32 stimule la prolifération des cellules HUVEC et que cet effet est inhibé par ces 2 formes solubles de HLA de classe I. HLA Gs et HLA B7s inhibent la prolifération induite par l'anticorps W6/32.

15

La figure 6 illustre les effets de modulation de l'expression de ICAM-1 sur cellules HUVEC par cytométrie en flux. Des cellules HUVEC sont mises en présence de HLAG-s, HLAB-7 en présence ou absence de VEGF 2 heures à 37°C. 500 000 cellules collectées par grattage sont incubées 2 heures à 4°C avec 2 µg/ml d'anticorps anti-ICAM-1. Après lavage un anticorps anti Fc de souris couplé au FITC dilué 1/100 est ensuite incubé pendant une demi-heure. Deux lavages en PBS-BSA 0,2% sont de nouveau réalisés puis les cellules sont analysés par cytométrie en flux.

25

La figure 7 illustre les effets de la molécule HLA-Gs sur la migration des cellules endothéliales. Cette expérience montre que les molécules HLA-Gs et HLA B7s n'ont pas d'effet sur la migration spontanée des cellules. En revanche un excès molaire de 4 fois seulement suffit à inhiber pratiquement totalement l'activité chimiotactique du VEGF.

30

Il a été démontré (Figure 5) que la dimérisation de molécules HLA de classe I transmembranaires induite par

35

la ligation à l'aide de l'anticorps W6/32 stimulait la prolifération des cellules HUVEC. Pour déterminer si cette ligation était aussi efficace sur les cellules FBAE, ces cellules ont été soumises à l'action de l'anticorps W6/32 en présence ou absence de HLA-Gs ou HLA B7s. Il apparaît que W6/32 stimule la migration des cellules FV et que cet effet est inhibé par ces 2 formes solubles de molécules HLA de classe I.

La figure 7 montre en outre les résultats des tests d'inhibition de l'action anti-chimiotactique de HLA GS ou HLA B7 par l'anticorps W6/32. Les cellules FBAE sont ensemencées à forte densité (40 000 cellules/puits) dans des boîtes de 12 puits en présence de 2 ng/ml de VEGF. 2 jours après la confluence la prolifération cellulaire est arrêtée par le transfert en milieu ne contenant ni sérum ni VEGF pendant 24 heures. Une blessure est alors pratiquée dans la monocouche par grattage à l'aide d'une pointe mousse, les cellules rincées abondamment puis les modulateurs sont ajoutés. Chaque condition est étudiée dans deux puits différents. 24 heures après les cellules sont rincées avec du milieu DMEM, colorées au May Grunwald-Giemsa et les cellules ayant migré sont comptées dans 8 champs par condition.

La figure 8 montre les effets des molécules HLA-Gs sur la croissance tumorale des cellules PC3 transfectées avec HLA-Gs. Six millions de cellules de PC3 transfectées par le vecteur contrôle (PC3-P3) ou le vecteur contenant la séquence codante de HLA Gs (clones PC3-Gs11, 15 et 16) sont inoculées à 7 souris nude. Au bout de 20 jours, le volume tumoral est mesuré 2 fois par semaine. Les mesures sont réalisées par un opérateur ignorant l'allocation des souris dans chacun des 4 groupes. Au 53<sup>ième</sup> jours, les souris sont sacrifiées et la tumeur est pesée.

Les temps de doublement ont été analysés par la cinétique de la prolifération de chacun des clones. La mesure ELISA anti-HLAGs a été réalisée avec l'anticorps 87G.

5 L'analyse de la cinétique de prolifération des transfectants ne fait pas apparaître de différence significative entre les cellules transfectées avec le vecteur vide (temps de doublement de 30 heures) et les transfectants portant la séquence codante de HLA-Gs (temps  
10 de doublement de 32 heures), ni non plus de la synthèse de VEGF. Il apparaît donc que l'expression de HLA-Gs ne joue ni sur la viabilité ni sur le potentiel angiogénique de la cellule cancéreuse. En revanche l'analyse des milieux conditionnés démontre que leur activité de stimulation de  
15 la prolifération des cellules endothéliales est diminuée dans les transfectants portant la séquence du HLA-Gs.

L'inoculation des transfectants à des souris nude fait apparaître des différences significatives entre les cellules transfectées avec le vecteur vide (temps de  
20 doublement de 50 heures) et les transfectants portant la séquence codante de HLA-Gs (diminution du volume tumoral de 40 %, 80 % et 98 % respectivement pour les clones 11, 15 et 16.

25 La figure 9 rapporte l'identification du récepteur endothélial pour les molécules HLA G solubles.

HLA-Gs et HLA B7s n'ont pas d'effet sur la migration spontanée des cellules. En revanche un excès molaire de 4 fois seulement suffit à inhiber pratiquement  
30 totalement l'activité chimiotactique du VEGF.

Comme indiqué ci-dessus, il a été démontré (Figure 5) que la dimérisation de molécules HLA de classe I transmembranaires induite par la ligation à l'aide de l'anticorps W6/32 stimulait la migration cellulaire.

L'utilisation d'anticorps dirigés contre des récepteurs connus de HLA-Gs a été étudiée.

Comme montré à la figure 8 l'anticorps CL1-R2 dirigé contre le récepteur BY55, connu pour être un  
5 récepteur de HLA-Gs sur les cellules lymphocytaires NK, inhibe aussi l'action de HLA-Gs sur la migration des cellules endothéliales. Donc BY55 est un récepteur endothélial pour HLA-Gs.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bian H, Harris PE, Reed EF, Ligation of HLA class I molecules on smooth muscle cells with anti-HLA antibodies induces tyrosine phosphorylation, fibroblast growth factor receptor expression and cell proliferation. *Int Immunol* 1998 Sep;10(9):1315-23.
- Blaschitz A., Lenfant F., Mallet V., Hartmann M., Bensussan A., Geraghty D. E., Le Bouteiller P. and Dohr G. (1997) Endothelial cells in chorionic fetal vessels of first trimester placenta express HLA-G. *Eur J Immunol* 27, 3380-8.
- Crisa L., McMaster M. T., Ishii J. K., Fisher S. J. and Salomon D. R. (1997) Identification of a thymic epithelial cell subset sharing expression of the class Ib HLA-G molecule with fetal trophoblasts. *J Exp Med* 186, 289-98.
- Fournel S., Aguerre-Girr M., Campan A., Salauze L., Berrebi A., Lone Y., Lenfant F. and Le Bouteiller P. (1999) Soluble HLA-G: purification from eucaryotic transfected cells and detection by a specific ELISA. *Am J Reprod Immunol* 42, 22-29.
- FOURNEL, S., HUC, X., AGUERRE-GIRR, M., SOLIER, C., LEGROS, M., PRAUD-BRETHENOU, C., MOUSSA, M., CHAOUAT, G., BERREBI, A., BENSUSSAN, A., LENFANT, F., LE BOUTEILLER, P. (2000a) Comparative reactivity of different HLA-G monoclonal antibodies to soluble HLA-G molecules. *Tissue Antigens*, 55, 510-518.
- FOURNEL, S., AGUERRE-GIRR, M., HUC, X., LENFANT, F., ALAM, A., TOUBERT, A., BENSUSSAN, A., LE BOUTEILLER, P. (2000b) Cutting Edge : Soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8. *Journal of Immunology*, 164, 6100-6104
- Fujii T., Ishitani A. and Geraghty D. E. (1994) A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a

messenger ribonucleic acid containing intron 4. *J Immunol* 153, 5516-24.

- Grumet F. C., Krishnaswamy S., See-Tho K., Filvaroff E. and Hiraki D. D. (1994) Soluble form of an  
5 HLA-B7 class I antigen specifically suppresses humoral  
alloimmunization. *Hum Immunol* 40, 228-34.

- Hammer A., Hutter H., Blaschitz A., Mahnert W., Hartmann M., Uchanska-Ziegler B., Ziegler A. and Dohr G.  
(1997) Amnion epithelial cells, in contrast to trophoblast  
10 cells, express all classical HLA class I molecules together  
with HLA-G. *Am J Reprod Immunol* 37, 161-71.

- Hara N., Fujii T., Yamashita T., Kozuma S., Okai T. and Taketani Y. (1996) Altered expression of human  
leukocyte antigen G (HLA-G) on extravillous trophoblasts in  
15 preeclampsia: immunohistological demonstration with anti-  
HLA-G specific antibody "87G" and anti-cytokeratin antibody  
"CAM5.2". *Am J Reprod Immunol* 36, 349-58.

- Hunt J. S., Chu W. and Miller L. (1998)  
Nonspecific immunity in the uterus and placenta.  
20 *Trophoblast Res* 12, 125-134.

- Hutchings H, Ortéga N, Tournier JF, Plouët J. Endothelial cells. Encyclopedic reference of vascular  
biology and pathology 2000, 80-85.

- Ishitani A. and Geraghty D. E. (1992)  
25 Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins  
with primary structures resembling both class I and class  
II antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3947-51.

- Jonca F, Ortéga N, Gleizes PE, Bertrand N, Plouët J. Cell release of bioactive fibroblast growth  
30 factor by exon 6 encoded sequence of vascular endothelial  
growth factor. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 24203-24209.

- Kirszenbaum M., Moreau P., Gluckman E., Dausset J. and Carosella E. (1994) An alternatively spliced form of  
HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the

presence of HLA-G transcript in adult lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4209-13.

- Lanier L. L. (1998) NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16, 359-93.

5       - Le Bouteiller P. (1994) HLA class I chromosomal region, genes, and products: facts and questions. *Crit Rev Immunol* 14, 89-129.

      - Le Bouteiller P. and Blaschitz A. (1999) The functionality of HLA-G is emerging. *Immunol Rev* 167, 233-  
10 244.

      - Le Bouteiller P., Solier C., Pröll J., Aguerre-Girr M., Fournel S. and Lenfant F. (1999) Placental HLA-G protein expression in vivo: where and what for?. *Hum Reprod Update* 5, 223-33.

15       - Leach L., Bhasin Y., Clark P. and Firth J. A. (1994) Isolation of endothelial cells from human term placental villi using immunomagnetic beads. *Placenta* 15, 355-64.

      - Loke Y. W. and King A. (1995) *Human implantation: cell biology and immunology*. Cambridge University Press, Cambridge.

      - Maejima M., Fujii T., Kozuma S., Okai T., Shibata Y. and Taketani Y. (1997) Presence of HLA-G-expressing cells modulates the ability of peripheral blood  
25 mononuclear cells to release cytokines. *Am J Reprod Immunol* 38, 79-82.

      - Mallet V., Blaschitz A., Crisa L., Schmitt C., Fournel S., King A., Loke Y., Dohr G. and Le Bouteiller P. (1999) HLA-G in human thymus: subpopulation of medullary  
30 epithelial but not CD83+ dendritic cells expresses HLA-G as a membrane bound and soluble protein. *Int Immunol* 11, 889-898.

      - Mallet V., Pröll J., Solier C., Aguerre-Girr M., DeRossi M., Loke Y., Lenfant F. and Le Bouteiller P.  
35 The full length HLA-G1 and no other alternative form of

HLA-G is expressed at the cell surface of transfected cells. *Human Immunology*, 2000, 61, 212-224.

- Ober C. and Aldrich C. L. (1997) HLA-G polymorphisms: neutral evolution or novel function? *J Reprod Immunol* 36, 1-21.

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

- Plouët, J., Schilling, J., Gospodarowicz, D. (1989). Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by pituitary AT t20 cells. *EMBO J.* 8, 3801-3806.

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

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

- Proll J., Blaschitz A., Hutter H. and Dohr G. (1999) First trimester human endovascular trophoblast cells express both HLA-C and HLA-G. *Am J Reprod Immunol* 42, 30-6.

- Puppo F., Costa M., Contini P., Brenci S., Cervasco E., Ghio M., Norelli R., Bensussan A., Capitano G. and Indiveri F. (1999) Determination of soluble HLA-G and HLA-A, -B, and -C molecules in pregnancy. *Transpl Proc* 31, 1841-1843.

- Rebmann V., Pfeiffer K., Passler M., Ferrone S., Maier S., Weiss E. and Grosse-Wilde H. (1999) Detection

of soluble HLA-G molecules in plasma and amniotic fluid.  
*Tissue Antigens* 53, 14-22.

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

## REVENDICATIONS

1) Utilisation d'une molécule soluble HLA de classe 1 ou d'une molécule d'acide nucléique comprenant une séquence polynucléotidique codant pou une molécule soluble HLA de classe 1 pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à inhiber l'angiogénèse ou à détecter des sites angiogéniques.

2) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la molécule soluble HLA de classe 1, est choisie parmi les molécules HLA-G1s ou HLA-B7s, ou un dérivé de celles-ci.

3) Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que la molécule soluble HLA de classe 1 est choisie parmi la molécule HLA-G1s ou une isoforme de celle-ci.

4) Utilisation d'une molécule d'acide nucléique comprenant une séquence polynucléotidique codant une molécule soluble HLA de classe 1, ladite séquence étant placée sous le contrôle de séquences de régulation de son expression.

5) Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique est destinée au traitement des pathologies comprenant le cancer, les rétinopathies diabétiques, la polyarthrite rhumatoïde, le rejet chronique de greffes comme la cornée ou le rein ou le rejet aigu observé dans les xénotransplantations, les angiomes, les angiosarcomes, en particulier la maladie de Castelman ou le sarcome de Kaposi.

6) Utilisation de la molécule HLA-G1s associée à une substance d'intérêt pour la préparation d'une composition destinée à inhiber l'angiogénèse ou à détecter des sites angiogéniques.

5

7) Composé constitué de la molécule HLA-G1s couplé à une substance d'intérêt, ledit composé étant capable de se fixer aux cellules endothéliales par l'intermédiaire d'un récepteur.

1/9

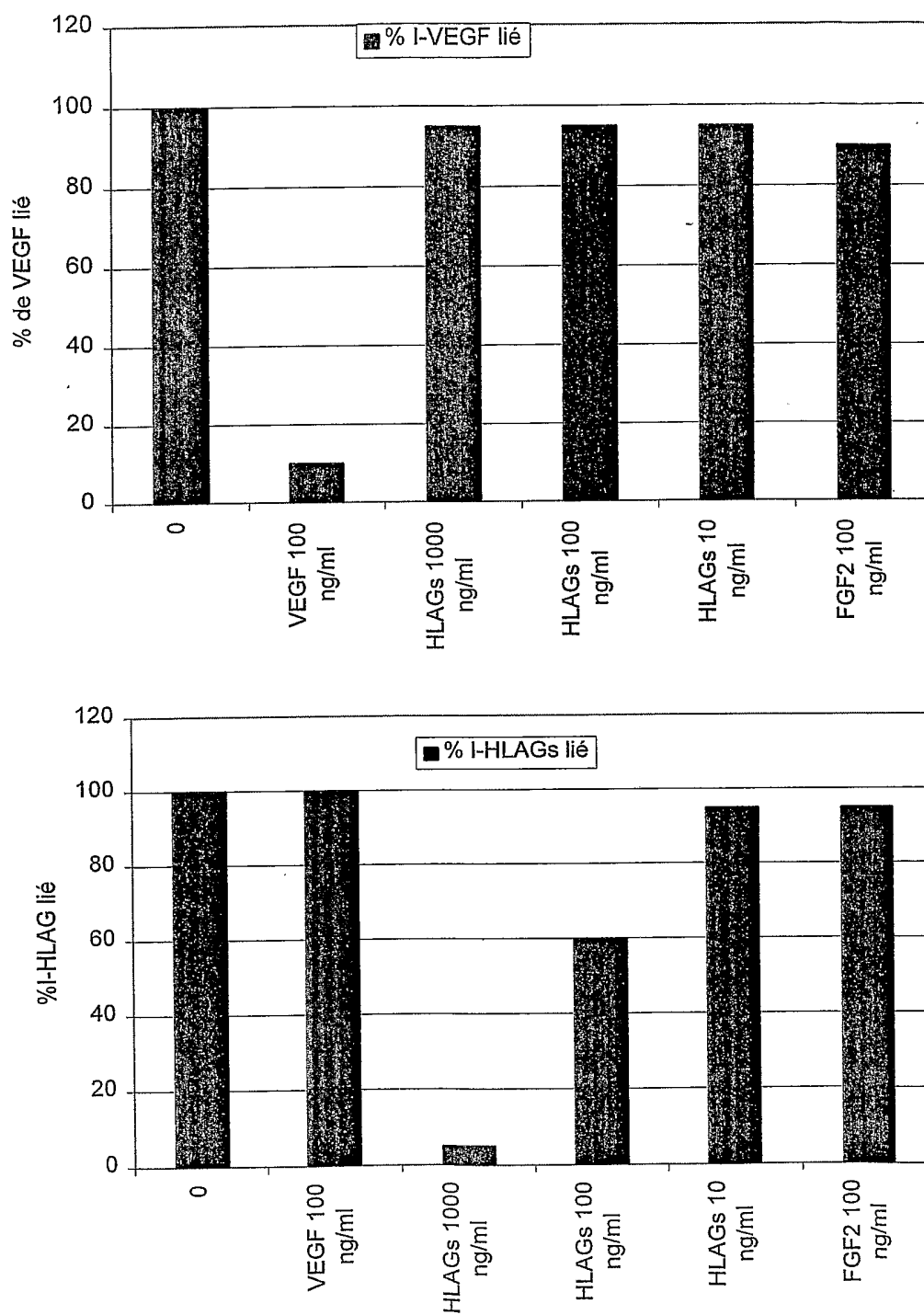


Figure 1

2/9

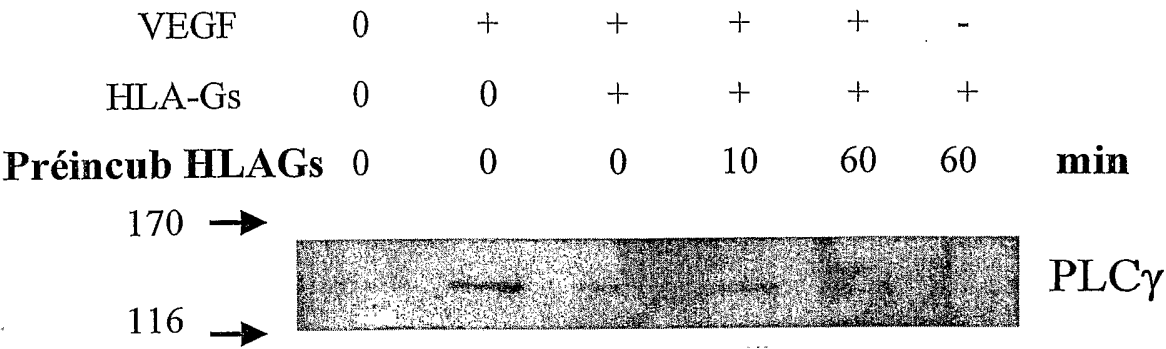


Figure 2

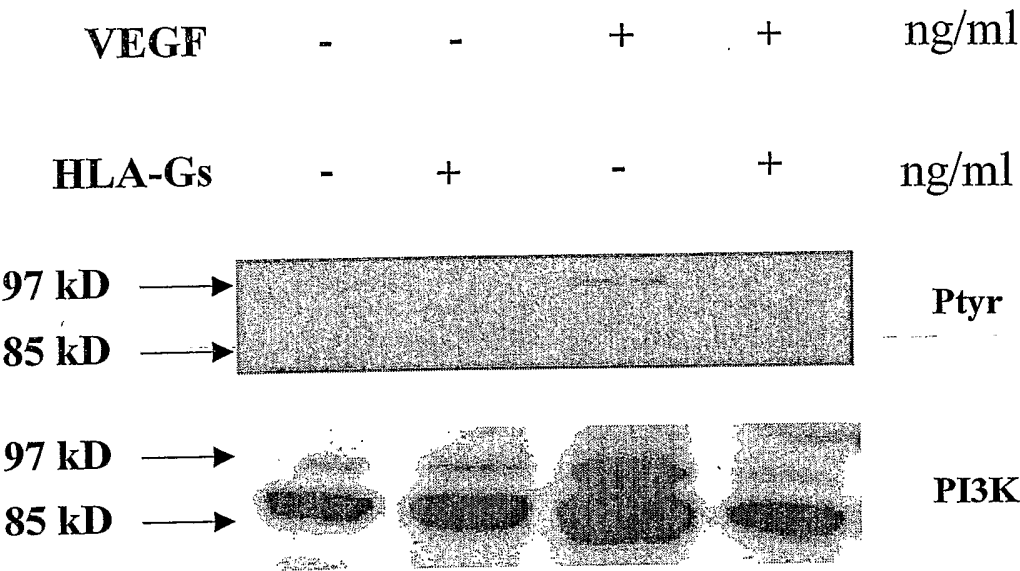


Figure 3

4/9

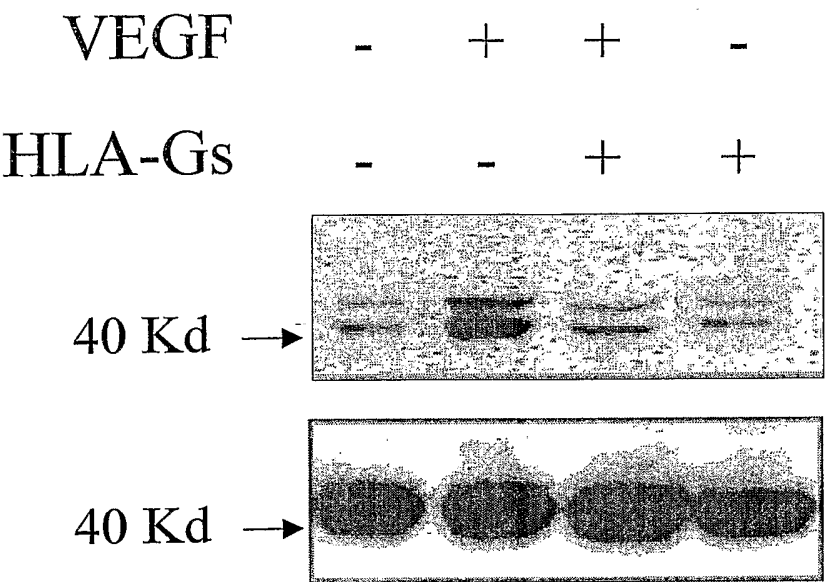


Figure 4

5/9

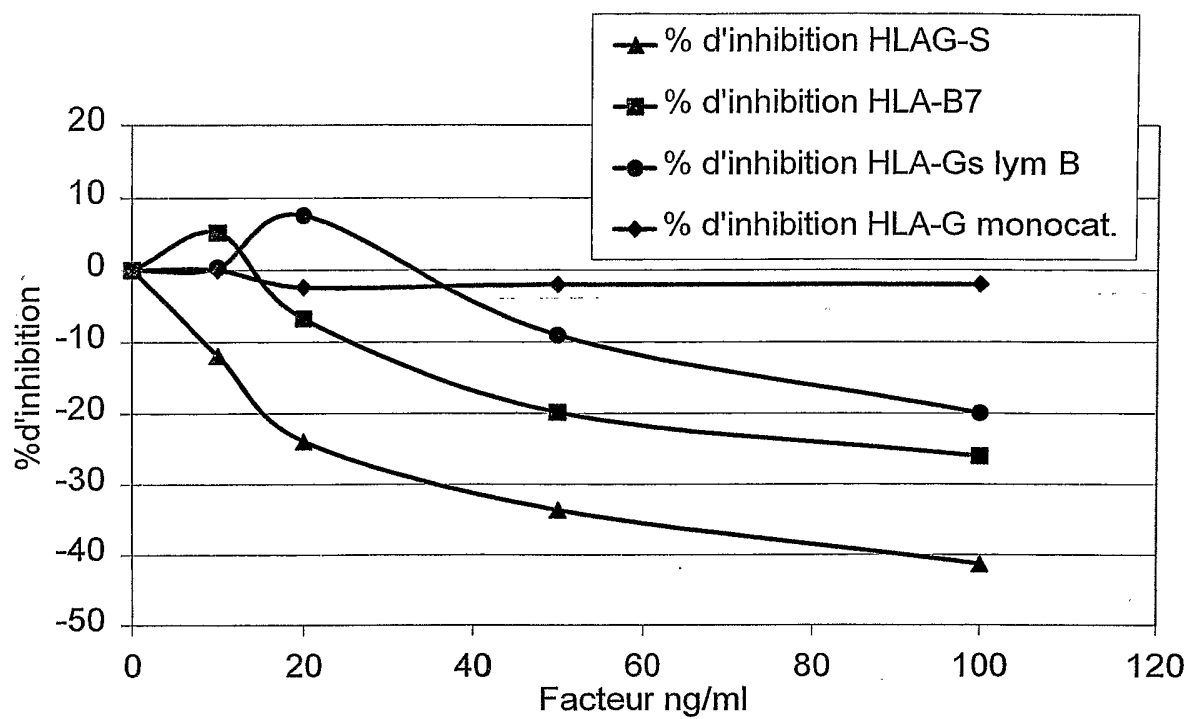


Figure 5

6/9

|                     | 0   | + VEGF (50ng/ml) |
|---------------------|-----|------------------|
| 0                   | 3.8 | 8.6              |
| + HLA-Gs (50 ng/ml) | 5   | 5,4              |
| + HLA-B7 (50 ng/ml) | 4,8 | 5,8              |

Moyenne de fluorescence

Figure 6

7/9

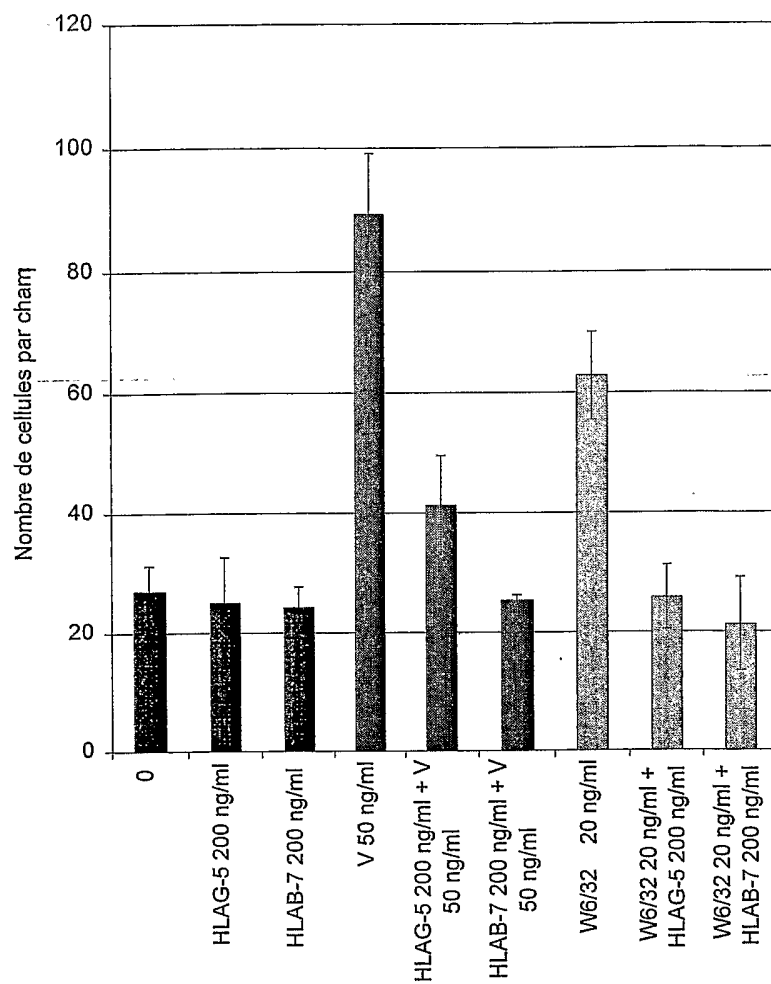


Figure 7

8/9

| Clones    | Temps de doublement | ELISA Ac anti-HLAGs | Nombre de souris avec prise tumorale/ Nombre de souris total |
|-----------|---------------------|---------------------|--------------------------------------------------------------|
| PC3-P3    | 30 Heures           | 0                   | 6/7                                                          |
| PC3-Gs 11 | 40 Heures           | +                   | 4/7                                                          |
| PC3-Gs 15 | 24 Heures           | ++                  | 3/7                                                          |
| PC3-Gs 16 | 32 Heures           | ++                  | 3/15                                                         |

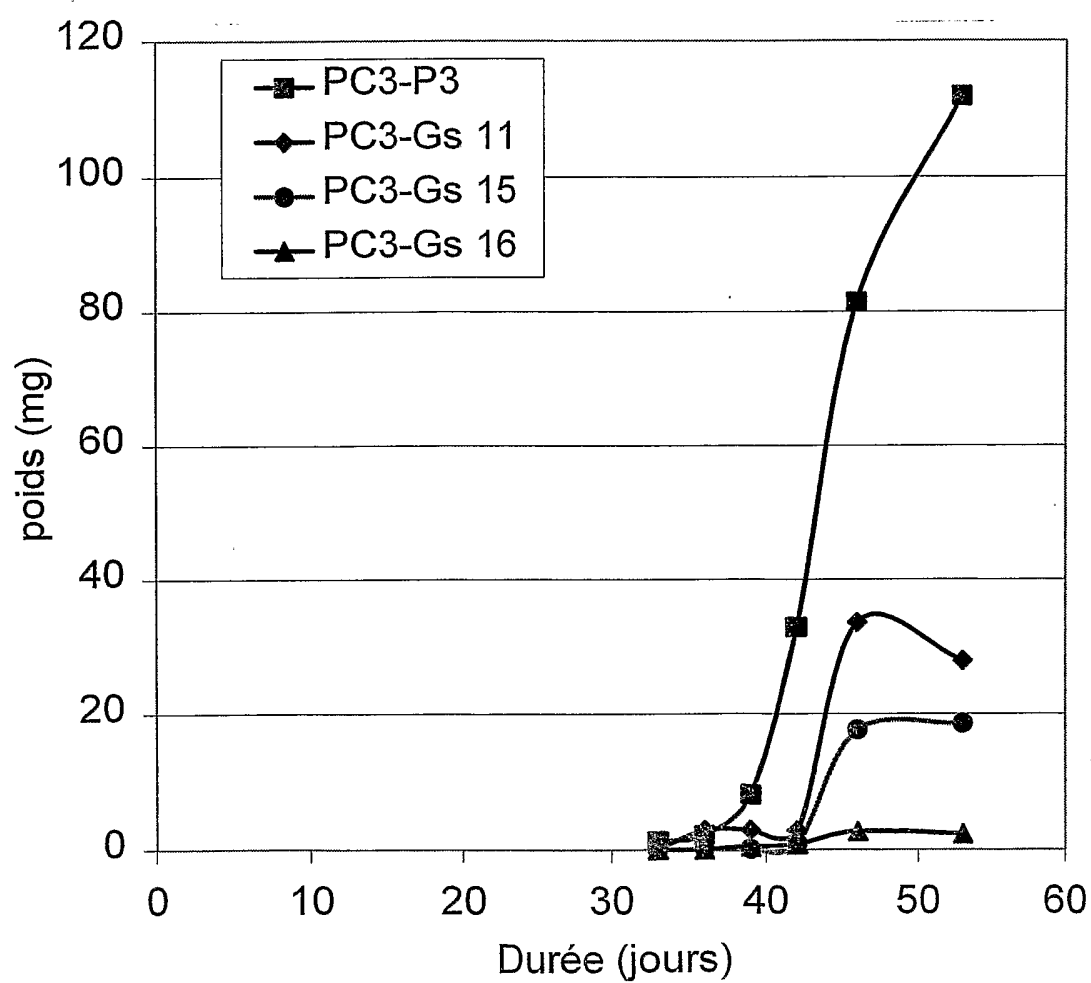
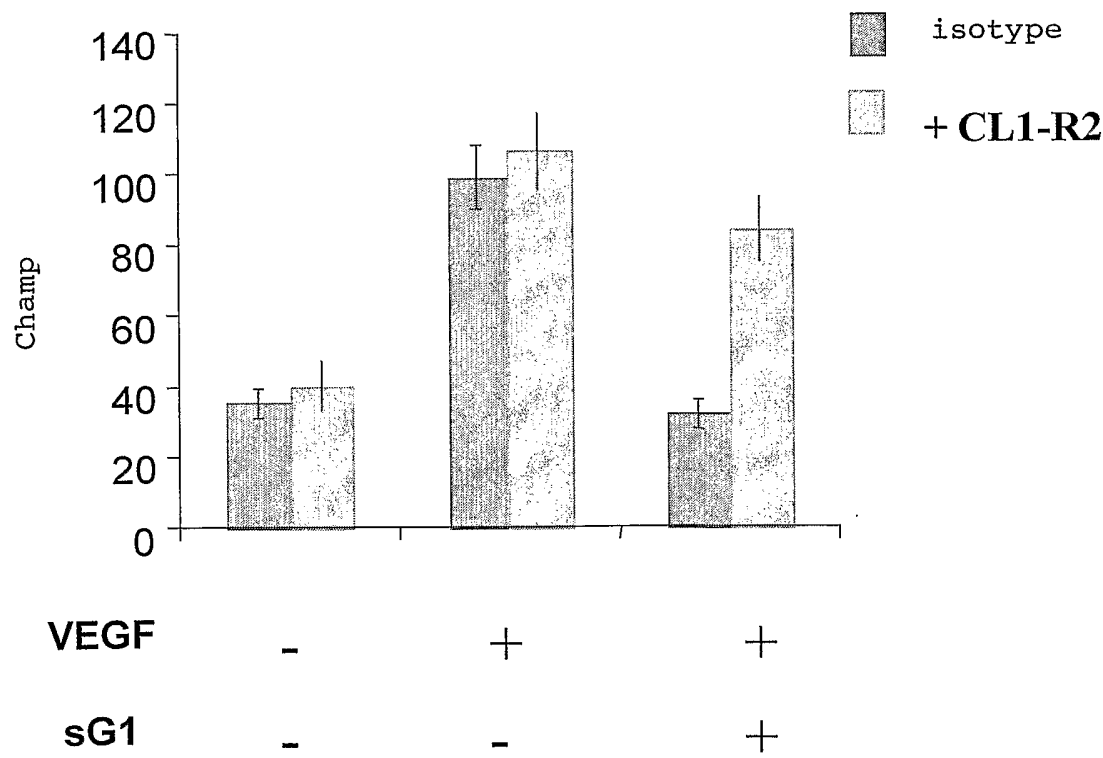


Figure 8

Fig.9



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/02812

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K38/17 A61K48/00 A61K47/48 A61P35/00 A61P37/06  
 //A61K49/14, A61K51/08

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C07K

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

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

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

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category ° | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Relevant to claim No. |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X          | <p>FUJII T ET AL: "A SOLUBLE FORM OF THE HLA-G ANTIGEN IS ENCODED BY A MESSENGER RIBONUCLEIC ACID CONTAINING INTRON 4" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 153, no. 12, 15 December 1994 (1994-12-15), pages 5516-5524, XP002061945 ISSN: 0022-1767 cited in the application the whole document</p> <p style="text-align: center;">---<br/>-/--</p> | 4                     |



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 November 2002

Date of mailing of the international search report

29/11/2002

Name and mailing address of the ISA

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

Authorized officer

Ryckebosch, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/02812

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Relevant to claim No. |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A          | <p>P. LE BOUTEILLER ET AL.: "Placental HLA-G protein expression in vivo: where and what for?"<br/> HUMAN REPRODUCTION UPDATE,<br/> vol. 5, no. 3, 1999, pages 223-233,<br/> XP001051115<br/> cited in the application<br/> page 230, left-hand column, paragraph 3<br/> -right-hand column, paragraph 1<br/> ---</p>                                                  | 1-7                   |
| A          | <p>A. BLASCHITZ ET AL.: "Endothelial cells in chorionic fetal vessels of first trimester placenta express HLA-G."<br/> EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY,<br/> vol. 27, no. 12, December 1997 (1997-12),<br/> pages 3380-3388, XP008010900<br/> cited in the application<br/> page 3386, right-hand column, paragraph 3<br/> ---</p>                                     | 1-7                   |
| A          | <p>P. LE BOUTEILLER ET AL.: "The functionality of HLA-G is emerging."<br/> IMMUNOLOGICAL REVIEWS,<br/> vol. 167, 1999, pages 233-244, XP008005346<br/> Copenhagen, DK<br/> cited in the application<br/> page 242, right-hand column, paragraph 2<br/> -page 243, right-hand column, last line<br/> ---</p>                                                           | 1-7                   |
| A          | <p>S. FOURNEL ET AL.: "Cutting edge: Soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8"<br/> THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY,<br/> vol. 164, no. 12,<br/> 15 June 2000 (2000-06-15), pages<br/> 6100-6104, XP002204753<br/> BALTIMORE, US<br/> cited in the application<br/> * page 6100, résumé *<br/> ---</p>   | 1-7                   |
| A          | <p>REBMANN V ET AL: "DETECTION OF SOLUBLE HLA-G MOLECULES IN PLASMA AND AMNIOTIC FLUID"<br/> TISSUE ANTIGENS, MUNKSGAARD, COPENHAGEN, DK,<br/> vol. 53, no. 1, January 1999 (1999-01),<br/> pages 14-22, XP000989657<br/> ISSN: 0001-2815<br/> cited in the application<br/> page 21, left-hand column, paragraph 2<br/> -right-hand column, last line<br/> -----</p> | 1-7                   |

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 02/02812

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K38/17 A61K48/00 A61K47/48 A61P35/00 A61P37/06  
//A61K49/14, A61K51/08

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

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

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

CIB 7 A61K C07K

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

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

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

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie ° | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents                                                                                                                                                                                                                                                   | no. des revendications visées |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| X           | FUJII T ET AL: "A SOLUBLE FORM OF THE HLA-G ANTIGEN IS ENCODED BY A MESSENGER RIBONUCLEIC ACID CONTAINING INTRON 4" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 153, no. 12, 15 décembre 1994 (1994-12-15), pages 5516-5524, XP002061945 ISSN: 0022-1767 cité dans la demande le document en entier<br>-----<br>-/-- | 4                             |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

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

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

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

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

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

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

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

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

\*&amp;\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

20 novembre 2002

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

29/11/2002

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

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

Fonctionnaire autorisé

Ryckebosch, A

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                               |
|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Catégorie                                       | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents                                                                                                                                                                                                                                                               | no. des revendications visées |
| A                                               | <p>P. LE BOUTEILLER ET AL.: "Placental HLA-G protein expression in vivo: where and what for?"<br/>HUMAN REPRODUCTION UPDATE,<br/>vol. 5, no. 3, 1999, pages 223-233,<br/>XP001051115<br/>cité dans la demande<br/>page 230, colonne de gauche, alinéa 3<br/>-colonne de droite, alinéa 1<br/>---</p>                                                         | 1-7                           |
| A                                               | <p>A. BLASCHITZ ET AL.: "Endothelial cells in chorionic fetal vessels of first trimester placenta express HLA-G."<br/>EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY,<br/>vol. 27, no. 12, décembre 1997 (1997-12),<br/>pages 3380-3388, XP008010900<br/>cité dans la demande<br/>page 3386, colonne de droite, alinéa 3<br/>---</p>                                         | 1-7                           |
| A                                               | <p>P. LE BOUTEILLER ET AL.: "The functionality of HLA-G is emerging."<br/>IMMUNOLOGICAL REVIEWS,<br/>vol. 167, 1999, pages 233-244, XP008005346<br/>Copenhagen, DK<br/>cité dans la demande<br/>page 242, colonne de droite, alinéa 2<br/>-page 243, colonne de droite, dernière ligne<br/>---</p>                                                           | 1-7                           |
| A                                               | <p>S. FOURNEL ET AL.: "Cutting edge: Soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8"<br/>THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY,<br/>vol. 164, no. 12,<br/>15 juin 2000 (2000-06-15), pages<br/>6100-6104, XP002204753<br/>BALTIMORE, US<br/>cité dans la demande<br/>* page 6100, résumé *<br/>---</p>      | 1-7                           |
| A                                               | <p>REBMANN V ET AL: "DETECTION OF SOLUBLE HLA-G MOLECULES IN PLASMA AND AMNIOTIC FLUID"<br/>TISSUE ANTIGENS, MUNKSGAARD, COPENHAGEN, DK,<br/>vol. 53, no. 1, janvier 1999 (1999-01),<br/>pages 14-22, XP000989657<br/>ISSN: 0001-2815<br/>cité dans la demande<br/>page 21, colonne de gauche, alinéa 2<br/>-colonne de droite, dernière ligne<br/>-----</p> | 1-7                           |

**Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)**

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n<sup>os</sup> 1, 2, 4, 5 se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:  
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
3. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

**Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n<sup>os</sup>
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n<sup>os</sup>

**Remarque quant à la réserve**

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: 1,2,4,5

Les revendications 1,2,4,5 présentes ont trait à l' utilisation d' une molécule défini en faisant référence à une caractéristique ou propriété souhaitable, à savoir une molécule soluble HLA de classe 1 (ou un dérivé de celle-ci).

Les revendications couvrent toutes les molécules présentant cette caractéristique ou propriété, alors que la demande ne fournit un fondement au sens de l'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT que pour un nombre très limité de telles molécules. Dans le cas présent, les revendications manquent de fondement et la demande manque d'exposé à un point tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible. Indépendamment des raisons évoquées ci-dessus, les revendications manquent aussi de clarté. En effet, on a cherché à définir les molécules au moyen du résultat à atteindre. Ce manque de clarté est, dans le cas présent, de nouveau tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible. En conséquence, la recherche n'a été effectuée que pour les parties des revendications dont l'objet apparaît être clair, fondé et suffisamment exposé, à savoir les parties concernant les molécules telles que définies dans les revendications 2 (en partie), 3, 6 et 7, notamment les molécules HLA-G1s (ou une isoforme) et HLA-B7s.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.