

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

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



WIPO | PCT



(10) Numéro de publication internationale
WO 2021/074376 A1

(43) Date de la publication internationale
22 avril 2021 (22.04.2021)

(51) Classification internationale des brevets :
C07K 16/40 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)

FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2020/079208

(22) Date de dépôt international :
16 octobre 2020 (16.10.2020)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
FR1911722 18 octobre 2019 (18.10.2019) FR

Publiée:

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2(h))
- avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2(a))

(71) Déposants : UNIVERSITE DE TOURS [FR/FR] ; 60 rue du Plat d'Étain, BP 12050, 37020 TOURS CEDEX 1 (FR). CENTRE HOSPITALIER REGIONAL UNIVERSITAIRE DE TOURS [FR/FR] ; 2 boulevard Tonnelié, 37044 TOURS CEDEX 09 (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR] ; 101, rue de Tolbiac, F-75013 PARIS (FR).

(72) Inventeurs : LEMOINE, Roxane ; 6 Allée Barbara, 37230 SAINT ETIENNE DE CHIGNY (FR). HOARAU, Cyrille ; 11 rue du Cèdre, 37230 FONDETTES (FR). MORELLO, Eric ; 20 rue de la Rotière, Apt. 242, 37300 JOUE-LES-TOURS (FR). KORKMAZ, Brice ; 17 allée des Chênes, 37250 VEIGNE (FR). GALLAIS, Yann ; 33 rue Pierre Curie, 78470 SAINT-REMY LES CHEVREUSE (FR).

(74) Mandataire : GROSSET-FOURNIER, Chantal et al. ; GROSSET-FOURNIER & DEMACHY, 54, rue Saint-Lazare, 75009 PARIS (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES,

(54) Title: NOVEL HUMAN THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES AND USES THEREOF

(54) Titre : NOUVEAUX ANTICORPS MONOCLONAUX THERAPEUTIQUES HUMAINS ET LEURS UTILISATIONS

(57) Abstract: The invention relates to novel human therapeutic monoclonal antibodies and to the uses thereof.

(57) Abrégé : L'invention concerne de nouveaux anticorps monoclonaux thérapeutiques humains et leurs utilisations.



WO 2021/074376 A1

DESCRIPTION

TITRE : NOUVEAUX ANTICORPS MONOCLONAUX THERAPEUTIQUES HUMAINS ET LEURS UTILISATIONS

DOMAINE DE L'INVENTION

- 5 L'invention concerne de nouveaux anticorps monoclonaux thérapeutiques humains et leurs utilisations.

CONTEXTE DE L'INVENTION

Dans la granulomatose avec polyangéite (GPA ou maladie dite de « *de Wegener* »), la protéinase 3 du neutrophile (PR3) est la cible d'auto-anticorps (ANCA) qui conduit à une

10 activation délétère des polynucléaires neutrophiles (PMN), responsable d'une vascularite sévère, touchant essentiellement les reins, les poumons et le cerveau. Les traitements actuels de la GPA reposent sur des immunosuppresseurs, des corticoïdes, et plus récemment des anticorps anti-CD20. Il n'y a pas de ciblage précis des PMN mais une action globale sur l'inflammation et sur les cellules de l'immunité. Les anti-CD20 ciblent plus spécifiquement

15 les lymphocytes B circulants exprimant le marqueur de différenciation CD20. Cela permet d'obtenir une déléition des lymphocytes B producteurs d'auto-anticorps dirigés contre la PR3 des PMN (ANCA). Cependant, cette déléition n'est ni immédiate, ni sans effet secondaire sur l'immunité. En effet, les anti-CD20 délétent les lymphocytes B circulants mais n'ont pas d'effet direct sur les plasmocytes qui produisent les anticorps. Il faut donc attendre plusieurs

20 semaines pour voir une diminution des ANCA. Par ailleurs, les anti-CD20 ne ciblent pas spécifiquement les lymphocytes B producteurs d'ANCA, mais l'ensemble des lymphocytes B. La déléition des lymphocytes B est ainsi globale et peut induire une diminution de l'ensemble des immunoglobulines, laquelle peut conduire à un déficit immunitaire humoral avec des risques d'infections graves. Ce risque se majore avec l'utilisation des autres traitements

25 immunosuppresseurs qui sont prescrits le plus souvent pour plusieurs mois. Les traitements thérapeutiques actuels ne sont donc pas efficaces voire délétères pour le patient et de nombreux besoins médicaux demeurent à ce jour sans solution. Parmi ces derniers résident notamment le besoin d'obtenir un traitement plus rapidement efficace, et celui de réduire la durée et l'intensité des traitements immunosuppresseurs responsables

30 d'effets secondaires graves.

BREF APERÇU DE L'INVENTION

Dans ce contexte d'une recherche d'outils thérapeutiques adaptés et efficaces, et ainsi pallier aux manques actuels, un premier but de l'invention est de proposer un anticorps ciblant la protéinase 3 du neutrophile (PR3). Un second but de l'invention est de proposer des fragments de cet anticorps. Un troisième but de l'invention est de proposer les outils (acide nucléique, vecteur, *etc.*) permettant de produire ledit anticorps et/ou lesdits fragments. Enfin, un autre but de l'invention est de proposer des compositions pharmaceutiques et leurs utilisations.

DESCRIPTION DETAILLEE

10 La présente invention se rapporte à l'objet tel qu'il est défini et décrit ci-après. Par ailleurs et sauf indication contraire ou si le contexte s'y oppose, tous les termes ont leur sens ordinaire dans le(s) domaine(s) concerné(s).

Selon un premier aspect de l'invention, celle-ci a pour objet un anticorps monoclonal dirigé contre la protéinase 3 du neutrophile représentée par la séquence SEQ ID NO : 1, ledit anticorps monoclonal :

- étant spécifiquement dirigé contre un épitope conformationnel de ladite protéinase 3 du neutrophile ; et
 - étant capable d'inhiber d'au moins 30% la production de dérivés réactifs de l'oxygène par des neutrophiles,
- 20 ladite production de dérivés réactifs de l'oxygène étant induite par la présence d'auto-anticorps dirigés contre ladite protéinase 3 du neutrophile.

Dans l'invention, le terme « *anticorps* » se réfère à une immunoglobuline, protéine multimérique constituée de 4 chaînes participant à la réponse immunitaire acquise.

Les immunoglobulines sont bien connues de l'Homme de métier et sont constituées d'un assemblage de deux dimères constitués chacun d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère. Le complexe multimérique assemblé par la liaison d'une chaîne légère et d'une chaîne lourde par un pont disulfure entre deux cystéines, les deux chaînes lourdes étant elle-même également reliées entre elles par deux ponts disulfures.

Chacune des chaînes lourdes et des chaînes légères est constituée d'une région constante et d'une région variable. L'assemblage des chaînes qui composent un anticorps permet de définir une structure tridimensionnelle caractéristique en Y, où

- la base du Y correspond à la région constante Fc qui est reconnue par le complément et les récepteurs Fc, et
- l'extrémité des bras du Y correspondent à l'assemblage respectif des régions variables de la chaîne légère et variable de la chaîne lourde.

5 Plus précisément, chaque chaîne légère est constituée d'une région variable (V_L) et d'une région constante (C_L). Chaque chaîne lourde est constituée d'une région variable (V_H) et d'une région constante constituée de trois domaines constants C_{H1} , C_{H2} et C_{H3} . Les domaines C_{H2} et C_{H3} composent le domaine Fc.

10 La région variable de la chaîne légère est constituée de trois régions déterminant la reconnaissance de l'antigène (CDR) entourées de quatre domaines charpentes. La région variable de la chaîne lourde est également constituée de trois régions déterminant la reconnaissance de l'antigène (CDR) entourées de quatre domaines charpentes. Le repliement tridimensionnel de ces régions variables est tel que les 6 CDR sont exposés du même côté de la protéine et permettent la formation d'une structure spécifique reconnaissant un antigène
15 déterminé.

Les anticorps décrits dans l'invention sont isolés et purifiés, peuvent être recombinants, peuvent appartenir à n'importe quel isotype/classe (*e.g.* IgG, IgE, IgM, IgD, IgA et IgY) ou à une sous-classe (*e.g.* IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 et IgA2) et sont différents des anticorps naturels. Ces anticorps sont matures, c'est-à-dire qu'ils possèdent une structure
20 tridimensionnelle *ad hoc* leur permettant de reconnaître l'antigène, et possèdent toutes les modifications *post*-traductionnelles essentielles à leur reconnaissance antigénique, notamment la glycosylation et la formation de ponts disulfures intra et inter moléculaires.

Il s'agit plus particulièrement d'« anticorps monoclonaux », c'est-à-dire qu'ils ne reconnaissent qu'un seul déterminant antigénique de la protéinase 3 du neutrophile (PR3),
25 contrairement aux anticorps polyclonaux qui correspondent à un mélange d'anticorps, et donc peuvent reconnaître plusieurs déterminants antigéniques d'une même protéine. En particulier, il convient de noter que les anticorps monoclonaux de l'invention ciblent spécifiquement un « épitope conformationnel » de la PR3, lequel est formé/constitué par des acides aminés qui ne sont pas contigus dans la séquence SEQ ID NO : 1. Cependant, certains desdits acides
30 aminés peuvent être immédiatement à côté les uns des autres et ainsi un épitope conformationnel selon la présente invention ne peut contenir qu'un seul acide aminé qui n'est pas contigu aux autres dans la séquence SEQ ID NO : 1.

Dans l'invention, l'expression « *production de dérivés réactifs de l'oxygène* » (en anglais *reactive oxygen species*, ROS) se réfère en particulier aux mécanismes cellulaires permettant aux neutrophiles de produire des espèces chimiques oxygénées telles que des radicaux libres, des ions oxygénés et des peroxydes, rendus chimiquement très réactifs par la présence d'électrons de valence non appariés. Il peut s'agir par exemple de l'anion superoxyde O_2^- , de l'oxygène singulet O_2^* , du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , ou encore de l'ozone O_3 , lesquelles peuvent, par exemple, être en évidence par le marquage DHR123-FITC (détection peroxyde d'hydrogène H_2O_2) du par cytométrie en flux (*cf.* Exemples, point 14). En particulier, il convient de noter que les anticorps monoclonaux de l'invention sont capables « *d'inhiber d'au moins 30%* » cette production de dérivés réactifs de l'oxygène par des neutrophiles, lesquels s'activent en présence d'auto-anticorps (ANCA) dirigés contre ladite protéinase 3 du neutrophile. Par ailleurs et au sens de l'invention, l'expression « *d'au moins 30%* » doit s'entendre comme pouvant être d'au moins 35%, d'au moins 40%, d'au moins 45%, d'au moins 50%, d'au moins 55%, d'au moins 60%, d'au moins 65%, d'au moins 70% ou d'au moins 75%. Cela peut également signifier que la capacité d'inhibition de ladite production de dérivés réactifs de l'oxygène par les anticorps de l'invention peut être comprise de 30% à 80% ou de 36% à 71%.

Du fait que l'anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) de l'invention (tel que défini ci-dessus) possède avantageusement cette caractéristique inattendue d'inhibition particulière, l'invention répond aux problématiques soulevées. En effet, l'action d'un anticorps étant immédiate sur des cellules circulantes ou endothéliales, dans la GPA, où la cible des PMN est la cellule endothéliale, l'anticorps monoclonal de l'invention :

- provoque une inhibition compétitive immédiate et spécifique de l'interaction PR3/ANCA, et
- permet de bloquer/inhiber/neutraliser rapidement et efficacement l'activation délétère des PMN (*e.g.* production de dérivés réactifs de l'oxygène) et donc l'inflammation délétère qui en découle.

Cet effet permet également de manière avantageuse, en limitant les lésions endothéliales dès les premiers jours de traitement, de réduire les risques de séquelles notamment rénales, pulmonaires et cérébrales. Par ailleurs, il convient de noter que l'expression « *anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié)* » signifie que l'anticorps monoclonal de l'invention peut être :

- recombinant ;

- isolé et purifié ; ou
- recombinant, isolé et purifié.

Selon un autre mode de réalisation, l'invention a pour objet l'anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que défini précédemment comprenant :

- 5
- une chaîne lourde comprenant de son extrémité N-terminale à son extrémité C-terminale :
 - un CDR1 ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 15 ;
 - un CDR2 ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 17 ; et
 - un CDR3 ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 19 ;
- 10 et
- une chaîne légère comprenant de son extrémité N-terminale à son extrémité C-terminale :
 - un CDR1 ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 31 ;
 - un CDR2 ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 33 ; et
 - 15 - un CDR3 ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 35.

Au sens de l'invention, cette identité de séquence entre une séquence d'acides aminés d'intérêt et une séquence d'acides aminés de référence (*e.g.* CDR1 de la chaîne lourde ; SEQ ID NO : 15) étant d'au moins 80%, cela signifie qu'elle peut être d'au moins 81%, d'au moins 82%, d'au moins 83%, d'au moins 84%, d'au moins 85%, d'au moins 86%, d'au moins 20 87%, d'au moins 88%, d'au moins 89%, d'au moins 90%, d'au moins 91%, d'au moins 92%, d'au moins 93%, d'au moins 94%, d'au moins 95%, d'au moins 96%, d'au moins 97%, d'au moins 98% ou d'au moins 99%. Plus particulièrement, elle est d'au moins 93%. La mesure de cette identité de séquence ainsi que de toutes celles décrites par la suite dans l'invention, le sont par les outils classiques de comparaison de séquences connues de l'Homme du métier 25 tels que les algorithmes de la plateforme BLAST ou préférentiellement le programme MatGat2.01 sous l'algorithme BLOSUM 50 (Campanella, J. J., Bitincka, L., & Smalley, J. (2003). MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. *BMC Bioinformatics*, 4, 29.).

Selon un autre mode de réalisation, l'invention a pour objet l'anticorps monoclonal 30 (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que défini précédemment comprenant :

- une chaîne lourde comprenant de son extrémité N-terminale à son extrémité C-terminale :

- le CDR1 de séquence SEQ ID NO : 15 ;
 - le CDR2 de séquence SEQ ID NO : 17 ; et
 - le CDR3 de séquence SEQ ID NO : 19 ;
- et
- 5 ▪ une chaîne légère comprenant de son extrémité N-terminale à son extrémité C-terminale :
- le CDR1 de séquence SEQ ID NO : 31 ;
 - le CDR2 de séquence SEQ ID NO : 33 ; et
 - le CDR3 de séquence SEQ ID NO : 35.
- 10 Selon un autre mode de réalisation, l'invention a pour objet l'anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que défini précédemment comprenant :
- une chaîne lourde comprenant une région variable ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 7, étant entendu que ladite région variable de la chaîne lourde comprend de son extrémité N-terminale à son extrémité C-terminale :
- 15 -
- le CDR1 de séquence SEQ ID NO : 15 ;
 - le CDR2 de séquence SEQ ID NO : 17 ; et
 - le CDR3 de séquence SEQ ID NO : 19 ;
- et
- une chaîne légère comprenant une région variable ayant au moins 80% d'identité avec
- 20 la séquence SEQ ID NO : 25, étant entendu que ladite région variable de la chaîne légère comprend de son extrémité N-terminale à son extrémité C-terminale :
- le CDR1 de séquence SEQ ID NO : 31 ;
 - le CDR2 de séquence SEQ ID NO : 33 ; et
 - le CDR3 de séquence SEQ ID NO : 35.
- 25 Selon un autre mode de réalisation, l'invention a pour objet l'anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que défini précédemment comprenant :
- une chaîne lourde comprenant la région variable de séquence SEQ ID NO : 7 ;
- et
- une chaîne légère comprenant la région variable de séquence SEQ ID NO : 25.
- 30 Selon un autre mode de réalisation, l'invention a pour objet l'anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que défini précédemment comprenant :

- une chaîne lourde comprenant ou constituée d'une séquence ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 3, étant entendu que ladite chaîne lourde comprend la région variable de séquence SEQ ID NO : 7 ;
et
- 5 ▪ une chaîne légère comprenant ou constituée d'une séquence ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 21, étant entendu que ladite chaîne légère comprend la région variable de séquence SEQ ID NO : 25.

De manière particulière, l'invention a pour objet l'anticorps monoclonal tel que défini précédemment comprenant :

- 10 ▪ une chaîne lourde comprenant ou constituée de la séquence SEQ ID NO : 3 ou de la séquence SEQ ID NO : 37 ;
et
- une chaîne légère comprenant ou constituée de la séquence SEQ ID NO : 21.

Plus précisément, ce mode de réalisation correspond à l'anticorps dit « 4C3 » d'allotype G1m3 – 1 (SEQ ID NOs : 3 et 21) ou à sa forme recombinante « r4C3 » d'allotype 15 G1m17 – 1 (SEQ ID NOs : 37 et 21) et dont l'ensemble des séquences est dans le tableau 1 ci-après, lesquels ne se différencient que d'une seule mutation à savoir, R > K en position 224 (ou AGA > AAA en position 670-672) au sein de la région constante de la chaîne lourde.

		4C3		r4C3	
		Acide nucléique SEQ ID NO :	Acide aminé SEQ ID NO :	Acide nucléique SEQ ID NO :	Acide aminé SEQ ID NO :
Chaîne lourde	Complète	2	3	36	37
	Région constante	4	5	38	39
	Région variable	6	7	6	7
	Région V	8	9	8	9
	Région D	10	11	10	11
	Région J	12	13	12	13
	CDR1	14	15	14	15
	CDR2	16	17	16	17
	CDR3	18	19	18	19
Chaîne légère	Complète	20	21	20	21
	Région constante	22	23	22	23
	Région variable	24	25	24	25
	Région V	26	27	26	27
	Région J	28	29	28	29
	CDR1	30	31	30	31
	CDR2	32	33	32	33
CDR3	34	35	34	35	

Tableau 1 : Séquences des anticorps 4C3 et r4C3

Selon un autre mode de réalisation particulier, l'invention a pour objet l'anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que défini précédemment comprenant :

- 5 ▪ une chaîne lourde comprenant de son extrémité N-terminale à son extrémité C-terminale :
 - un CDR1 ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 15 ;
 - un CDR2 ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 17 ; et
 - un CDR3 ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 19 ;
 et
- 10 ▪ une chaîne légère comprenant de son extrémité N-terminale à son extrémité C-terminale :
 - un CDR1 ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 31 ;

- un CDR2 ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 33 ; et
- un CDR3 ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 35,

en particulier comprenant :

- une chaîne lourde comprenant une région variable ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 7, étant entendu que ladite région variable de la chaîne lourde comprend de son extrémité N-terminale à son extrémité C-terminale :
 - le CDR1 de séquence SEQ ID NO : 15 ;
 - le CDR2 de séquence SEQ ID NO : 17 ; et
 - le CDR3 de séquence SEQ ID NO : 19 ;

10 et

- une chaîne légère comprenant une région variable ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 25, étant entendu que ladite région variable de la chaîne légère comprend de son extrémité N-terminale à son extrémité C-terminale :
 - le CDR1 de séquence SEQ ID NO : 31 ;
 - le CDR2 de séquence SEQ ID NO : 33 ; et
 - le CDR3 de séquence SEQ ID NO : 35,

15

et de préférence comprenant :

- une chaîne lourde comprenant ou constituée d'une séquence ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 3, étant entendu que ladite chaîne lourde comprend la région variable de séquence SEQ ID NO : 7 ;
- et
- une chaîne légère comprenant ou constituée d'une séquence ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 21, étant entendu que ladite chaîne légère comprend la région variable de séquence SEQ ID NO : 25.

20

25

Selon un second aspect de l'invention, celle-ci a pour objet un fragment d'un anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que décrit précédemment. Dans l'invention, le terme « *fragment* » désigne toute partie d'un anticorps qui conserve la capacité de se lier à l'épitope reconnu par l'anticorps complet. Des exemples de tels fragments incluent, sans s'y limiter, Fab, Fab' et F(ab')₂, Fd, les Fv à chaîne unique (scFv), les anticorps à chaîne unique, les Fv liés par un pont disulfure (dsFv) et des fragments comprenant la région V_L ou V_H. Les fragments se liant à l'épitope, y compris les anticorps à chaîne unique,

30

peuvent comprendre la ou les régions variables seules ou en combinaison avec l'intégralité ou une partie des éléments suivants : région charnière, domaines C_{H1}, C_{H2} et C_{H3}.

De tels fragments peuvent contenir un ou les deux fragments Fab ou le fragment F(ab')₂. En outre, les fragments peuvent être ou peuvent combiner des membres de l'une quelconque des classes d'immunoglobulines suivantes : IgG, IgM, IgA, IgD ou IgE et leurs sous-classes.

Les fragments Fab et F(ab')₂ peuvent être produits par clivage protéolytique, en utilisant des enzymes telles que la papaine (fragment Fab) ou la pepsine (fragment F(ab')₂).

Les fragments « Fv à chaîne unique » (« scFv ») sont des fragments se liant à un épitope qui contiennent au moins un fragment d'une région variable (V_H) d'anticorps liée à au moins un fragment d'une région variable (V_L) d'anticorps à chaîne légère. Le linker peut être un peptide court et flexible choisi pour assurer que le repliement correct en trois dimensions des régions V_L et V_H se produit une fois qu'elles sont liées, de manière à maintenir la spécificité de liaison à la molécule cible de l'anticorps entier à partir duquel le fragment d'anticorps à chaîne unique est dérivé. L'extrémité carboxyle de la séquence V_L ou V_H peut être liée de manière covalente par un agent de liaison à l'extrémité aminoacide d'une séquence V_L ou V_H complémentaire.

Selon un mode de réalisation particulier de ce second aspect, l'invention a pour objet le fragment ci-dessus d'un anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que défini précédemment, ledit fragment étant choisi parmi le groupe de fragments constitué de : Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂, « diabodies ».

Ceci étant, il est entendu au sens de l'invention que celle-ci a pour objet le fragment ci-dessus d'un anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que défini précédemment, ledit fragment comprenant la combinaison des six (6) CDR ayant au moins 80% d'identité avec les séquences SEQ ID NOs ; 15, 17, 19, 31, 33 et 35.

Au sens de l'invention, cette identité de séquence entre une séquence d'acides aminés d'intérêt et une séquence d'acides aminés de référence (e.g. CDR1 de la chaîne lourde ; SEQ ID NO : 15) étant d'au moins 80%, cela signifie qu'elle peut être d'au moins 81%, d'au moins 82%, d'au moins 83%, d'au moins 84%, d'au moins 85%, d'au moins 86%, d'au moins 87%, d'au moins 88%, d'au moins 89%, d'au moins 90%, d'au moins 91%, d'au moins 92%, d'au moins 93%, d'au moins 94%, d'au moins 95%, d'au moins 96%, d'au moins 97%, d'au moins 98% ou d'au moins 99%. Plus particulièrement, elle est d'au moins 93%. La mesure de cette identité de séquence ainsi que de toutes celles décrites par la suite dans l'invention, le

sont par les outils classiques de comparaison de séquences connues de l'Homme du métier tels que les algorithmes de la plateforme BLAST ou préférentiellement le programme MatGat2.01 sous l'algorithme BLOSUM 50 (Campanella, J. J., Bitincka, L., & Smalley, J. (2003). MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. *BMC Bioinformatics*, 4, 29.).

Selon un autre mode de réalisation, l'invention a pour objet le fragment ci-dessus d'un anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que défini précédemment, ledit fragment comprenant la combinaison des six (6) CDR de séquences SEQ ID NOs ; 15, 17, 19, 31, 33 et 35.

10 Selon un autre mode de réalisation, l'invention a pour objet le fragment ci-dessus d'un anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que défini précédemment, ledit fragment comprenant :

- 15 ▪ une région variable d'une chaîne lourde ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 7, étant entendu que ladite région variable de la chaîne lourde comprend de son extrémité N-terminale à son extrémité C-terminale :
 - le CDR1 de séquence SEQ ID NO : 15 ;
 - le CDR2 de séquence SEQ ID NO : 17 ; et
 - le CDR3 de séquence SEQ ID NO : 19 ;et
- 20 ▪ une région variable d'une chaîne légère ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 25, étant entendu que ladite région variable de la chaîne légère comprend de son extrémité N-terminale à son extrémité C-terminale :
 - le CDR1 de séquence SEQ ID NO : 31 ;
 - le CDR2 de séquence SEQ ID NO : 33 ; et
 - 25 - le CDR3 de séquence SEQ ID NO : 35.

Selon un autre mode de réalisation, l'invention a pour objet le fragment ci-dessus d'un anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que défini précédemment, ledit fragment comprenant :

- 30 ▪ une région variable d'une chaîne lourde de séquence SEQ ID NO : 7 ; et
- une région variable d'une chaîne légère de séquence SEQ ID NO : 25.

Selon un troisième aspect de l'invention, celle-ci a pour objet un acide nucléique comprenant ou constitué d'une séquence codant :

- l'anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que défini précédemment ; ou
- 5 ▪ la chaîne lourde d'un anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que défini précédemment et/ou la chaîne légère d'un anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que défini précédemment ; ou
- le fragment tel que défini précédemment.

Selon un autre mode de réalisation de ce troisième aspect, l'invention a pour objet l'acide nucléique tel que défini précédemment comprenant ou constitué d'une séquence codant :

- une chaîne lourde comprenant de son extrémité N-terminale à son extrémité C-terminale :
 - un CDR1 ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 14 ;
 - un CDR2 ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 16 ; et
 - 15 - un CDR3 ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 18 ;et/ou
- une chaîne légère comprenant de son extrémité N-terminale à son extrémité C-terminale :
 - un CDR1 ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 30 ;
 - 20 - un CDR2 ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 32 ; et
 - un CDR3 ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 34.

Au sens de l'invention, cette identité de séquence entre une séquence d'acides nucléiques d'intérêt et une séquence d'acides nucléiques de référence (*e.g.* CDR1 de la chaîne lourde ; SEQ ID NO : 14) étant d'au moins 80%, cela signifie qu'elle peut être d'au moins 81%, d'au moins 82%, d'au moins 83%, d'au moins 84%, d'au moins 85%, d'au moins 86%, d'au moins 87%, d'au moins 88%, d'au moins 89%, d'au moins 90%, d'au moins 91%, d'au moins 92%, d'au moins 93%, d'au moins 94%, d'au moins 95%, d'au moins 96%, d'au moins 97%, d'au moins 98% ou d'au moins 99%. Plus particulièrement, elle est d'au moins 93%. La mesure de cette identité de séquence ainsi que de toutes celles décrites par la suite dans l'invention, le sont par les outils classiques de comparaison de séquences connues de l'Homme du métier tels que les algorithmes de la plateforme BLAST ou préférentiellement le programme MatGat2.01 (Campanella, J. J., Bitincka, L., & Smalley, J. (2003). MatGAT: an application

that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. *BMC Bioinformatics*, 4, 29.).

Selon un autre mode de réalisation de ce troisième aspect, l'invention a pour objet l'acide nucléique tel que défini précédemment comprenant ou constitué d'une séquence codant :

- 5 ▪ une chaîne lourde comprenant de son extrémité N-terminale à son extrémité C-terminale :
- le CDR1 de séquence SEQ ID NO : 14 ;
 - le CDR2 de séquence SEQ ID NO : 16 ; et
 - le CDR3 de séquence SEQ ID NO : 18 ;
- 10 et/ou
- une chaîne légère comprenant de son extrémité N-terminale à son extrémité C-terminale :
- le CDR1 de séquence SEQ ID NO : 30 ;
 - le CDR2 de séquence SEQ ID NO : 32 ; et
 - 15 - le CDR3 de séquence SEQ ID NO : 34.

Selon un autre mode de réalisation de ce troisième aspect, l'invention a pour objet l'acide nucléique tel que défini précédemment comprenant ou constitué d'une séquence codant :

- une chaîne lourde comprenant une région variable ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 6, étant entendu que ladite région variable de la chaîne
- 20 lourde comprend de son extrémité N-terminale à son extrémité C-terminale :
- le CDR1 de séquence SEQ ID NO : 14 ;
 - le CDR2 de séquence SEQ ID NO : 16 ; et
 - le CDR3 de séquence SEQ ID NO : 18 ;
- et/ou
- 25 ▪ une chaîne légère comprenant une région variable ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 24, étant entendu que ladite région variable de la chaîne légère comprend de son extrémité N-terminale à son extrémité C-terminale :
- le CDR1 de séquence SEQ ID NO : 30 ;
 - le CDR2 de séquence SEQ ID NO : 32 ; et
 - 30 - le CDR3 de séquence SEQ ID NO : 34.

Selon un autre mode de réalisation de ce troisième aspect, l'invention a pour objet l'acide nucléique tel que défini précédemment comprenant ou constitué d'une séquence codant :

- une chaîne lourde comprenant la région variable de séquence SEQ ID NO : 6 ;
et/ou
- une chaîne légère comprenant la région variable de séquence SEQ ID NO : 24.

Selon un autre mode de réalisation de ce troisième aspect, l'invention a pour objet l'acide nucléique tel que défini précédemment comprenant ou constitué d'une séquence codant :

- une chaîne lourde comprenant ou constituée d'une séquence ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 2, étant entendu que ladite chaîne lourde comprend la région variable de séquence SEQ ID NO : 6 ;
et/ou
- une chaîne légère comprenant ou constituée d'une séquence ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 20, étant entendu que ladite chaîne légère comprend la région variable de séquence SEQ ID NO : 24.

De manière particulière, l'invention a pour objet l'acide nucléique tel que défini précédemment comprenant ou constitué d'une séquence codant :

- une chaîne lourde comprenant ou constituée de la séquence SEQ ID NO : 2 ou de la séquence SEQ ID NO : 36 ;
et/ou
- une chaîne légère comprenant ou constituée de la séquence SEQ ID NO : 20.

Plus précisément, ce mode de réalisation correspond à l'anticorps dit « 4C3 » d'allotype G1m3 – 1 (SEQ ID NOs : 2 et 20) ou à sa forme recombinante « r4C3 » d'allotype G1m17 – 1 (SEQ ID NOs : 36 et 20) et dont l'ensemble des séquences est dans le tableau 1 ci-dessus, lesquels ne se différencient que d'une seule mutation à savoir, R > K en position 224 (ou AGA > AAA en position 670-672) au sein de la région constante de la chaîne lourde.

Selon un autre mode de réalisation particulier de ce troisième aspect, l'invention a pour objet un vecteur d'expression comprenant au moins un acide nucléique tel que défini précédemment, ledit acide nucléique étant sous contrôle d'éléments permettant son expression.

Par « vecteur d'expression », il est défini dans l'invention une molécule d'ADN (acide désoxyribonucléique) qui possède des éléments permettant sa répllication (duplication) dans au moins un organisme vivant. Ces éléments permettant la répllication sont notamment des origines de répllication de levure ou de bactéries, ou encore des éléments de contrôle de la répllication d'un virus.

Les vecteurs selon l'invention sont notamment des plasmides, des phages, des chromosomes artificiels de levure (YAC), des chromosomes artificiels de bactéries (BAC), les génomes modifiés de virus répliatifs ou de virus intégratifs, *etc.*

5 Ces vecteurs sont dits « *d'expression* » car ils disposent de séquences nucléotidiques qui permettent l'expression, c'est-à-dire la transcription en ARN (acide ribonucléique), des séquences nucléotidiques qu'elles contrôlent.

Dans l'invention, ladite séquence d'acide nucléique contenue dans ledit vecteur est placée « *sous contrôle des éléments permettant son expression* ». Cela signifie que ledit vecteur d'expression possède au moins une séquence d'initiation de la transcription tel qu'un
10 promoteur d'un virus comme le promoteur précoce du virus simien SV40, ou du Cytomégalo virus (CMV) ou encore les séquences promotrices du virus du sarcome de Rous (RSV), et notamment une séquence ou promoteur comprenant une boîte TATAA. De plus, ledit vecteur possède également au moins une séquence de terminaison de la transcription et en particulier une séquence de polyadénylation issues d'un gène de mammifère, notamment
15 humain.

A ces séquences indispensables pour l'expression de la séquence nucléotidique contenue dans ledit vecteur peuvent s'ajouter d'autres séquences permettant de réguler ou de moduler l'expression de la dite séquence. Une liste non exhaustive comprend : des introns de gènes de mammifères, et notamment humains, des séquences de régulation de transcription de type
20 amplificateur (« *enhancers* ») ou encore des séquences transcrites mais non traduites de gènes de mammifères, et notamment humains.

Un mode de réalisation particulier de l'invention a donc pour objet un vecteur d'expression tel que défini précédemment, comprenant :

- 25 ▪ un premier acide nucléique choisi parmi ceux codant tout ou une partie de la chaîne lourde de l'anticorps monoclonal tel que décrit précédemment, ledit premier acide nucléique étant sous contrôle des éléments permettant son expression ; et
- un second acide nucléique choisi parmi ceux codant tout ou une partie de la chaîne légère de l'anticorps monoclonal tel que décrit précédemment, ledit second acide nucléique étant sous contrôle des éléments permettant son expression.

30 Ce vecteur d'expression comporte donc deux séquences d'acides nucléiques susmentionnées, et plus particulièrement comporte une séquence d'acide nucléique codant la chaîne lourde de l'anticorps monoclonal tel que décrit précédemment, et une séquence d'acide nucléique codant la chaîne légère de l'anticorps monoclonal tel que décrit précédemment.

Préférentiellement, ledit vecteur d'expression contient un premier élément permettant l'expression de la séquence d'acide nucléique codant la chaîne lourde de l'anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que décrit précédemment et un second élément permettant l'expression de la séquence d'acide nucléique codant la chaîne légère de l'anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que décrit précédemment, ledit premier et ledit second élément permettant l'expression desdites séquences d'acides nucléiques étant identiques ou différents, et préférentiellement identiques. Ces éléments de contrôle sont notamment les séquences terminales longues répétées (LTR) du virus RSV.

Selon un autre mode de réalisation particulier de ce troisième aspect, l'invention a pour objet une cellule hôte ou lignée cellulaire transformée par un acide nucléique tel que décrit précédemment et/ou un vecteur d'expression tel que décrit précédemment.

Selon un quatrième aspect de l'invention, celle-ci a pour objet l'utilisation d'au moins :

- un anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que décrit précédemment ; et/ou
- un fragment tel que décrit précédemment ; et/ou
- un acide nucléique tel que décrit précédemment ; et/ou
- un vecteur d'expression tel que décrit précédemment,

comme médicament. Autrement dit, l'invention a pour objet l'anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que décrit précédemment et/ou fragment tel que décrit précédemment et/ou acide nucléique tel que décrit précédemment et/ou vecteur d'expression tel que décrit précédemment pour son utilisation comme médicament.

Selon un autre mode de réalisation de ce quatrième aspect, l'invention a pour objet une composition pharmaceutique comprenant comme substance active au moins :

- un anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que décrit précédemment ; et/ou
- un fragment tel que décrit précédemment ; et/ou
- un acide nucléique tel que décrit précédemment ; et/ou
- un vecteur d'expression tel que décrit précédemment,

en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Par « *composition pharmaceutique* », il est entendu au sens de l'invention un conditionnement particulier de l'invention, lequel permet que la composition pharmaceutique de l'invention soit possiblement administrable aux animaux et aux êtres humains par voie orale, sublinguale, sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, transdermique, locale, inhalée ou rectale. Par
5 ailleurs, ce conditionnement permet également l'administration du principe actif (ou substance active), seul ou en combinaison avec un autre principe actif, sous forme unitaire ou en mélange avec des supports pharmaceutiques classiques. Les formes d'administration unitaires appropriées comprennent :

- 10 ▪ les formes d'administration par voie orale telles que les comprimés, les gélules, les poudres, les granules et les suspensions ou solutions orales ;
- les formes d'administration sublinguale et buccale, les aérosols, les implants ;
- les formes d'administration sous-cutanée, transdermique, intradermique, intrapéritonéale, intramusculaire, intraveineuse, sous cutanée, transdermique, intratrachéale et nasale ; et
- 15 ▪ les formes d'administration rectale.

Par « *véhicule pharmaceutiquement acceptable* », il est entendu au sens de l'invention un matériel non toxique qui est compatible avec un système biologique tel qu'une cellule, une culture cellulaire, un tissu ou un organisme animal ou humain. Il peut s'agir notamment :

- 20 ▪ de solutés cristalloïdes, par exemple chlorure de sodium, bicarbonate, glucose ;
- de lipides cationiques ;
- de composés peptidiques ; ou
- de surfactants, par exemple polysorbates.

Dans tous les cas et ce, quel que soit la formulation choisie, celle-ci doit être stérile, stable dans les conditions de fabrication et de stockage, et doit impérativement être préservée de
25 toute contamination par des micro-organismes, tels que les bactéries et les champignons.

Selon un autre mode de réalisation de ce quatrième aspect, l'invention a pour objet une composition pharmaceutique comprenant comme substance active au moins :

- 30 ▪ un anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que décrit précédemment, ledit anticorps monoclonal étant à une dose comprise de 5 mg à 1 000 mg, de préférence comprise de 100 mg à 800 mg ; et/ou
- un fragment tel que décrit précédemment, ledit fragment étant à une dose comprise de 5 mg à 1 000 mg, de préférence comprise de 100 mg à 800 mg ; et/ou

- un acide nucléique tel que décrit précédemment, ledit acide nucléique étant à une dose comprise de 5 mg à 1 000 mg, de préférence comprise de 100 mg à 800 mg ; et/ou
- un vecteur d'expression tel que décrit précédemment, ledit vecteur d'expression étant à une dose comprise de 5 mg à 1 000 mg, de préférence comprise de 100 mg à 800 mg,

5

en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Selon un autre mode de réalisation particulier de ce quatrième aspect, l'invention a pour objet une composition pharmaceutique comprenant comme substance active au moins :

- un anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que décrit précédemment ; et/ou
- un fragment tel que décrit précédemment ; et/ou
- un acide nucléique tel que décrit précédemment ; et/ou
- un vecteur d'expression tel que décrit précédemment,

10

en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable,

15

en particulier,

- ledit anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que décrit précédemment étant à une dose comprise de 5 mg à 1 000 mg ; et/ou
- ledit fragment tel que décrit précédemment étant à une dose comprise de 5 mg à 1 000 mg ; et/ou
- ledit acide nucléique tel que décrit précédemment étant à une dose comprise de 5 mg à 1 000 mg ; et/ou
- ledit vecteur d'expression tel que décrit précédemment étant à une dose comprise de 5 mg à 1 000 mg.

20

Au sens de l'invention, l'expression « *dose comprise de 5 mg à 1 000 mg* » signifie que la dose peut être comprise de 50 mg à 900 mg, de 100 mg à 800 mg, de 200 mg à 700 mg, de 300 mg à 600 mg, de 400 mg à 500 mg ou de 5 mg à 500 mg. Cela signifie également que la dose peut être de 5 mg, 10 mg, 50 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg, 500 mg, 550 mg, 600 mg, 650 mg, 700 mg, 750 mg, 800 mg, 850 mg, 900 mg, 950 mg ou 1 000 mg.

25

30 Selon un autre mode de réalisation de ce quatrième aspect, l'invention a pour objet une composition pharmaceutique telle que décrite précédemment, pour son utilisation dans le

traitement précoce et/ou la prévention de rechute des poussées de granulomatose avec polyangéite.

L'invention ayant pour but de proposer un outil de traitement précoce et/ou de prévention de rechute dans le cadre de la granulomatose avec polyangéite, laquelle est une vascularite nécrisante systémique grave, *i.e.* une inflammation avec nécrose des parois vasculaires, l'expression « *le traitement précoce et/ou la prévention de rechute* » s'entend au sens de l'invention comme étant l'utilisation de l'anticorps, du fragment d'anticorps, de l'acide nucléique ou du vecteur d'expression de l'invention tels que décrits précédemment chez un patient dès l'apparition des premiers signes cliniques de la pathologie et/ou d'une rechute, lesquels sont connus de l'Homme du métier et peuvent être par exemple :

- douleurs musculaires et/ou articulaires ;
- fièvre légère ;
- saignement du nez ;
- urine anormalement colorée ;
- hypertension artérielle ;
- crachats de sang ;
- fourmillements dans les membres ;
- *etc.*

Par ailleurs, « *précoce* » au sens de l'invention s'entend comme l'utilisation de l'anticorps, du fragment d'anticorps, de l'acide nucléique ou du vecteur d'expression de l'invention tels que décrits précédemment dès que le diagnostic de la pathologie est posé, ledit diagnostic pouvant notamment s'effectuer par la recherche de marqueur biologique tels que les auto-anticorps ANCA dans un test sanguin par exemple.

De même, « *une rechute* » au sens de l'invention s'entend comme étant la réapparition des signes cliniques de la pathologie (voir ci-dessus) après l'utilisation d'un traitement adapté (*e.g.* l'anticorps de l'invention) et qui a fonctionné suite à la primo-apparition de la pathologie. Le diagnostic de ces rechutes est donc en général plus rapide à faire, la maladie étant déjà connue.

Aussi et au vu de ce qui précède, l'expression « *le traitement précoce et/ou la prévention de rechute* » peut s'entendre comme étant l'utilisation (*i.e.* la mise en place d'une thérapie ponctuelle ou prolongée) de l'anticorps, du fragment d'anticorps, de l'acide nucléique ou du vecteur d'expression de l'invention tels que décrits précédemment chez un patient dans les

deux (2) à quatre (4) premières semaines suivant l'apparition des premiers signes cliniques de la pathologie et/ou d'une rechute.

Selon un autre mode de réalisation de ce quatrième aspect, l'invention a pour objet une composition pharmaceutique pour son utilisation telle que décrite précédemment, ladite
5 composition pharmaceutique comprenant en outre des anti-inflammatoires, tels que des corticoïdes, et/ou des immunosuppresseurs.

Selon un autre mode de réalisation de ce quatrième aspect, l'invention a pour objet une composition pharmaceutique pour son utilisation telle que décrite précédemment, dans laquelle :

- 10 ▪ ladite substance active est un anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que décrit précédemment, ledit anticorps monoclonal étant à une dose comprise de 1 mg/kg à 50 mg/kg, de préférence comprise de 5 mg/kg à 25 mg/kg ; et/ou
- 15 ▪ ladite substance active est un fragment tel que décrit précédemment, ledit fragment étant à une dose comprise de 1 mg/kg à 50 mg/kg, de préférence comprise de 5 mg/kg à 25 mg/kg ; et/ou
- ladite substance active est un acide nucléique tel que décrit précédemment, ledit acide nucléique étant à une dose comprise de 1 mg/kg à 50 mg/kg, de préférence comprise de 5 mg/kg à 25 mg/kg ; et/ou
- 20 ▪ ladite substance active est un vecteur d'expression tel que décrit précédemment, ledit vecteur d'expression étant à une dose comprise de 1 mg/kg à 50 mg/kg, de préférence comprise de 5 mg/kg à 25 mg/kg.

Au sens de l'invention, l'expression « *dose comprise de 1 mg/kg à 50 mg/kg* » signifie que la dose peut être comprise de 5 mg/kg à 45 mg/kg, de 10 mg/kg à 40 mg/kg, de 15 mg/kg à 35 mg/kg, de 20 mg/kg à 30 mg/kg, de 25 mg/kg à 50 mg/kg ou de 1 mg/kg à 10 mg/kg. Cela
25 signifie également que la dose peut être de 1 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg ou 50 mg/kg.

Selon un autre mode de réalisation de ce quatrième aspect, l'invention a pour objet une composition pharmaceutique unitaire pour son utilisation telle que décrite précédemment,
30 dans laquelle :

- ladite substance active est un anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que décrit précédemment, ledit anticorps monoclonal étant à une dose comprise de

70 mg à 3 500 mg par dose unitaire (*rapporté à un Homme de 70 kg*), de préférence comprise de 1 000 mg à 2 500 mg par dose unitaire (*rapporté à un Homme de 70 kg*) ; et/ou

- 5 ▪ ladite substance active est un fragment tel que décrit précédemment, ledit fragment étant à une dose comprise de 70 mg à 3 500 mg par dose unitaire (*rapporté à un Homme de 70 kg*), de préférence comprise de 1 000 mg à 2 500 mg par dose unitaire (*rapporté à un Homme de 70 kg*) ; et/ou
- 10 ▪ ladite substance active est un acide nucléique tel que décrit précédemment, ledit acide nucléique étant à une dose comprise de 70 mg à 3 500 mg par dose unitaire (*rapporté à un Homme de 70 kg*), de préférence comprise de 1 000 mg à 2 500 mg par dose unitaire (*rapporté à un Homme de 70 kg*) ; et/ou
- 15 ▪ ladite substance active est un vecteur d'expression tel que décrit précédemment, ledit vecteur d'expression étant à une dose comprise de 70 mg à 3 500 mg par dose unitaire (*rapporté à un Homme de 70 kg*), de préférence comprise de 1 000 mg à 2 500 mg par dose unitaire (*rapporté à un Homme de 70 kg*).

Au sens de l'invention, l'expression « *dose comprise de 70 mg à 3 500 mg par dose unitaire* » signifie que la dose peut être comprise de 100 mg à 3 000 mg, de 500 mg à 2 500 mg, de 1 000 mg à 2 000 mg, de 1 500 mg à 3 500 mg ou de 70 mg à 1 500 mg par dose unitaire. Cela signifie également que la dose peut être de 70 mg, 100 mg, 500 mg, 1 000 mg, 1 500 mg, 20 2 000 mg, 2 500 mg, 3 000 mg ou 3 500 mg par dose unitaire.

Selon un autre mode de réalisation de ce quatrième aspect, l'invention a pour objet une composition pharmaceutique pour son utilisation telle que décrite précédemment, ladite composition étant formulée pour être administrée par l'une des voies suivantes : orale, parentérale, injectable, topique, par inhalation, sous-cutanée, nasale ou pulmonaire.

25 Selon un autre mode de réalisation de ce quatrième aspect, l'invention a pour objet une méthode de traitement précoce et/ou de prévention de rechute précoce des poussées de granulomatose avec polyangéite d'un patient atteint de granulomatose avec polyangéite comprenant l'administration à une dose efficace d'au moins :

- 30 ▪ un anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que décrit précédemment ; et/ou
- un fragment tel que décrit précédemment ; et/ou
- un acide nucléique tel que décrit précédemment ; et/ou

- un vecteur d'expression tel que décrit précédemment.

En outre et selon un autre aspect de l'invention, celle-ci a pour objet un complexe immun anticorps/antigène, dans lequel :

- 5 ▪ ledit anticorps est l'anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que décrit précédemment ou un fragment tel que décrit précédemment ; et
- l'antigène est la protéinase 3 du neutrophile représentée par la séquence SEQ ID NO : 1.

L'invention a également pour objet un kit de diagnostic permettant le dosage de la
10 concentration sanguine de la protéinase 3 du neutrophile, ledit kit de diagnostic comprenant un anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que décrit précédemment ou un fragment tel que décrit précédemment.

L'invention, sur la base de cet aspect, a également pour objet une méthode de diagnostic *in vitro* comprenant une étape de détermination du complexe immun anticorps/antigène tel que
15 décrit précédemment à l'aide d'un anticorps monoclonal (recombinant et/ou isolé et purifié) tel que décrit précédemment ou d'un fragment tel que décrit précédemment, ledit dosage permettant de déterminer le degré de sévérité et/ou le risque de rechute de poussées de la granulomatose avec polyangéite chez un patient.

Il a été rapporté dans la littérature que le score BVAS (*i.e.* score utilisé pour quantifier la
20 sévérité de la pathologie) est corrélé au degré d'intensité de l'expression membranaire de la PR3. C'est-à-dire que plus le niveau d'expression membranaire de la PR3 est élevé, plus le degré de sévérité de la pathologie est élevé et *a fortiori* plus les atteintes cliniques sont graves. Puisque l'anticorps de l'invention tel que décrit précédemment cible spécifiquement la PR3, l'étude du niveau d'expression membranaire (mesure de fluorescence, MFI) et le pourcentage
25 de cellules exprimant la PR3 à la membrane par son intermédiaire s'avère donc être un outil de diagnostic avantageux.

De plus et bien qu'au cours de la maladie le pourcentage de cellules positives pour la PR3 reste inchangé, il ressort que les neutrophiles de patients en phase active de la maladie expriment plus de PR3 à la membrane que pendant la phase quiescente de la pathologie.
30 Aussi, si ce pourcentage d'expression membranaire de la PR3 augmente au cours d'un suivi régulier du patient, lequel peut être mis en évidence par l'anticorps de l'invention tel que

décrit précédemment (*e.g.* marquage de la PR3 par cytométrie en flux), le risque de rechute est rapidement identifié. Le traitement à adopter peut alors être rapidement et efficacement mis en œuvre à l'aide de la corrélation entre le niveau d'expression de la PR3 membranaire et la sévérité de la GPA.

5

La présente invention est par ailleurs illustrée, sans toutefois s'y limiter, par les figures et exemples suivants.

LISTE DES FIGURES

10 **Figure 1 : Identification et caractérisation de l'anticorps monoclonal humain anti-protéinase 3 (PR3) 4C3.**

A. Reconnaissance de la PR3 par 3 anticorps issus de l'immortalisation n°IM3-16 (4C3, 4C5 et 5D11) en ELISA. B. Vérification de la spécificité du 4C3 et du 5D11 en réponse à différents antigènes indiqués sur le graphique par ELISA (n = 5). C. Détermination de la sous-classe IgG du 4C3 par ELISA en comparaison avec un sérum de patient GPA (ANCA) contenant différentes sous-classes d'IgG anti-PR3 (n = 3). D. Détermination de la chaîne légère kappa (en noir) ou lambda (en blanc) du 4C3 en comparaison avec le sérum d'un patient GPA (n = 3). E. Détermination de la constante de dissociation à l'équilibre (K_D) du 4C3 par BIACORE™ vis-à-vis de la PR3.

20 **Figure 2 : Production et purification du 4C3.**

A. Confirmation de la monoclonalité du 4C3 par *Polymerase Chain Reaction* (PCR) par l'étude des réarrangements des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgH). B. Mise en production du clone 4C3 dans les surnageants de flasques haute densité (PRO 01-17 et PRO 02-18) et évolution du nombre de cellules récoltées au cours des productions PRO 01-17 (graphe de gauche) et PRO 02-18 (graphe de droite). C. Evaluation du niveau de production IgG anti-PR3 par ELISA au cours des productions PRO 01-17 (graphe de gauche) et PRO 02-18 (graphe de droite). D. Purification du 4C3 par chromatographie d'affinité (HiTrap™ *Protein A*). La pureté des différentes fractions a été contrôlée par SDS-PAGE et coloration au Bleu de Coomassie. NR : Non retenu ; E : Elutions ; Mq : Marqueur de taille ; Avt : Echantillon avant purification ; Tém : Ac IgG1 purifié. E. Reconnaissance de la PR3 par le 4C3 purifié issu de la production PRO 02-18 par ELISA anti-PR3 (*coating* avec 1 µg/mL de PR3).

30

Figure 3 : Spécificité de la reconnaissance de la PR3 par la forme recombinante du 4C3 (r4C3).

A. Comparaison de la liaison du 4C3 (histogrammes noirs) et du 4C3 recombinant (r4C3) (histogrammes gris foncé) vis-à-vis de la PR3 en comparaison avec la BSA et l'ovalbumine (Ova). Une expérience représentative des 3 réalisées est montrée. B. Détermination de la constante de dissociation à l'équilibre (K_D) du r4C3 par BIACORE™ vis-à-vis de la PR3.

Figure 4 : Modélisation et validation de l'épitope de la PR3 reconnu par le 4C3.

A. Reconnaissance de la PR3 par le 4C3 par western blot : la PR3 à différentes concentrations et sous forme native ou dénaturée a été déposée sur gel de polyacrylamide 4-12% Bis-Tris puis transférée sur membrane de nitrocellulose et saturée avec 5% de BSA. Incubation de la membrane avec l'anticorps 4C3 dilué au 1/10 000^{ème} une nuit à 4°C sous agitation. Révélation des protéines avec un anticorps secondaire anti-Fc humain couplé à la HRP. B. Modélisation *in silico* de l'épitope de la PR3 reconnu par le 4C3 par la méthode MabTope. C. Séquence en acides aminés de la PR3 (SEQ ID NO : 42) avec les peptides de validation testés soulignés. La probabilité des différents résidus de l'épitope est indiquée. D. Mesure par HTRF de la liaison entre un anticorps anti-Fab couplé au d2 qui se lie au 4C3 et une streptavidine couplé au terbium qui se lie aux différents peptides biotinylés de la PR3 (indiqués en abscisse). Résultats exprimés en ratio. ns : non significatif. E. Séquence en acides aminés de la PR3 dont la séquence signal, le di-propeptide, le pro-peptide, le patch hydrophobe, la triade catalytique et les peptides 3.2 et 4.1 sont indiqués :

- **En gras** : séquence signal ;
- AE soulignés : di-propeptide clivé par la cathepsine C ;
- De IVGGH.....IRSTLR : séquence N-terminale de la PR3 native active ;
- *En italique* : pro-peptide en C-terminal ;
- **En gras italique** : patch hydrophobe ;
- **En gras souligné** : triade catalytique ;
- TFFCRPHNICTFVPR : peptide 4C3_3.2 (SEQ ID NO : 40) ; et
- GTQCLAMGWGRVGAH : peptide 4C3_4.1 (SEQ ID NO : 41).

F. Effet de l'alpha 1 antitrypsine (α 1AT) dans la liaison de l'anticorps 4C3 à la PR3 en ELISA. La PR3 (2 μ g/mL) a été incubée ou non avec l'alpha 1 anti-trypsine à un ratio de 1 PR3 pour 5 α 1AT pendant une heure à 37°C avant d'être *coatée* dans des puits une nuit à 4°C. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type de la densité optique obtenue. * $p < 0,05$. La moyenne du pourcentage de diminution obtenu sur les 8 expériences est indiquée.

Figure 5 : Le 4C3 n'inhibe pas l'activité enzymatique de la PR3.

La PR3 (10nM) a été incubée ou non avec du 4C3, du 6H4 ou de l' α 1AT (50nM) pendant 30 minutes soit un ratio de 5:1 puis le substrat fluorescent de la PR3 a été ajouté. L'activité enzymatique a été mesurée au cours d'une cinétique par spectrofluorimétrie. Le contrôle négatif (ctl-) correspond au substrat seul. **A.** Représentation de la fluorescence obtenue au ratio de 5 Ac 4C3 pour 1 PR3. Des résultats similaires ont été obtenus avec les ratios 10:1 et 2:1. **B.** Représentation de la différence d'activité de la PR3 exprimée en Δ RFU. Une expérience représentative de 5 est montrée.

Figure 6 : Marquage du 4C3 à la surface des cellules immunitaires en cytométrie en flux.

A. Stratégie d'analyse des neutrophiles humains purifiés par cytométrie en flux (FACS) après élimination des doublets (« cellules seules ») puis marquage de la PR3 membranaire avec l'anticorps 4C3 couplé à l'AF488 (graphe en bas à droite). **B.** Des neutrophiles humains ont été purifiés à partir de sang d'un donneur sain puis ont été incubés ou non (histogramme « 0 μ g/ml ») avec différentes concentrations d'anticorps 4C3 couplés à l'AF488 (1, 20 ou 100 μ g/mL) pendant 20 minutes à 4°C afin d'étudier l'expression membranaire du 4C3. **C.** Des neutrophiles humains de donneurs sains ont été pré-activés (TNF α +) ou non (TNF α -) avec du TNF α à 2 ng/mL pendant 15 minutes avant d'être marqués avec du 4C3-AF488 à 20 μ g/ml pendant 20 minutes. Une expérience représentative des 10 réalisées est montrée. **D.** Les cellules du sang d'un donneur sain ont été marquées avec un mix CD45-APC H7 / CD3-BV786 / CD14-VioBlue / CD15-PE / 4C3-AF488 avant passage au FACS. Représentation du marquage de la PR3 avec le 4C3-AF488 à la surface des lymphocytes T (CD3⁺, histogramme gris clair), monocytes (CD14⁺, histogramme gris foncé) et des neutrophiles (CD15⁺, histogramme hachuré). Une expérience représentative des 5 réalisées est montrée.

Figure 7 : Marquage cytoplasmique du 4C3-AF488 de type cANCA.

Des neutrophiles purifiés de donneurs sains ont été fixés à l'éthanol (ligne du haut) ou au formol (ligne du bas) avant d'être marqués avec le marqueur nucléaire DAPI (1^{ère} colonne) et du 4C3-AF488 (1/100^{ème}) (2^{ème} colonne). Lecture des lames au microscope à fluorescence à l'objectif x60. Superposition des fluorescences (« Merged », 3^{ème} colonne) à l'aide du logiciel ImageJ. L'échelle (10 μ m) est indiquée sur les images en contraste de phase (« Brightfield », 4^{ème} colonne). Une expérience représentative des 3 réalisées est montrée.

Figure 8 : Le 4C3 reconnaît spécifiquement la PR3 native purifiée et la PR3 contenue dans les neutrophiles.

A. Des neutrophiles d'un patient GPA ont été purifiés puis pré-activés (TNF α +) ou non (TNF α -) avec du TNF α à 2 ng/mL pendant 15 minutes à 37°C. 10 μ g de neutrophiles (puits 1 et 2) ont été déposés en condition réduite. Des cellules HeLa ne possédant pas de PR3 ont été utilisées comme témoin négatif (3^{ème} puits) et la PR3 native humaine purifiée comme témoin positif (4^{ème} puits). Incubation des membranes avec l'anticorps Hsc70 (1/10 000^{ème}) ou l'anticorps 4C3 (1/10 000^{ème}) une nuit sous agitation à 4°C. B. Le 4C3 ne fixe pas les protéases Elastase et Cathepsine G (Cath G) mais uniquement la PR3 à 5 μ g et 2 μ g. Incubation du 4C3 sur la nuit à 4°C.

Figure 9 : Le 4C3 induit l'expression de la PR3 à la surface des neutrophiles pré-activés par rapport à un anticorps non relevant.

Des neutrophiles de donneurs sains ont été pré-activés par le TNF α à 2 ng/mL à 37°C durant 15 minutes (triangle), puis ont été incubés pendant 90 minutes à température ambiante avec l'anticorps monoclonal (AcMo) 4C3 (rond) et l'AcMo 6H4 (carré) à 2 μ g/mL (n = 3), à 20 μ g/mL (n = 4) et à 100 μ g/mL (n = 2) ou avec le PMA-ICa (triangle inversé). L'expression membranaire de la PR3 (mbPR3) a été analysée par cytométrie en flux après marquage avec l'anticorps anti-PR3 WGM2-FITC. La moyenne ainsi que les écart-types pour les donneurs sains sont représentés. Les résultats ont été normalisés par rapport à la condition TNF α et sont exprimés en ratio de l'intensité moyenne de fluorescence (*Mean Fluorescence Intensity* ; MFI). * p < 0,05.

Figure 10 : Le 4C3 n'induit pas la production d'espèces réactives oxygénées (*Reactive Oxygen Species* ; ROS) par les neutrophiles humain.

Des neutrophiles purifiés provenant de huit donneurs sains indépendants ont été pré-activés avec du TNF α (2 ng/mL) pendant 15 minutes à 37°C (colonnes blanches) avant d'être incubés pendant 45 minutes avec du 4C3 (colonnes grises), des préparations d'IgG (non mélangées) provenant de deux donneurs sains (colonnes hachurées) ou de quatre patients GPA actifs au moment du diagnostic (colonnes quadrillées) ou des IgG provenant du patient P2 (lignes verticales). La production de ROS a été évaluée en mesurant la fluorescence (MFI) du DHR 123 par cytométrie de flux. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM obtenus dans huit expériences indépendantes, chaque cercle représentant une expérience. NS : non significatif ; * p < 0,05 ; ** p < 0,005 ; *** p < 0.0005.

Figure 11 : Effet dose du 4C3 sur la production intracellulaire d'espèces réactives oxygénées (*Reactive Oxygen Species* ; ROS) par les neutrophiles.

Des neutrophiles de donneurs sains ont été incubés avec de la cytochélasine B (5 µg/mL) 5 minutes à 37°C puis du sodium azide (2 mM) et de la DHR (2,5 µM) ont été ajoutés 5 minutes à 37°C avant de pré-activer les neutrophiles avec du TNFα à 2 ng/mL à 37°C durant 15 minutes (triangle). A la fin de la pré-activation, les neutrophiles ont été incubés 45 minutes à 37°C avec l'AcMo 4C3 (rond) ou l'AcMo 6H4 (carré) à 2 µg/mL (n = 9), à 20 µg/mL (n = 20) et à 100 µg/mL (n = 4) ou avec le PMA-ICa (triangle inversé). La production de ROS a été analysée par cytométrie en flux par mesure de la MFI après marquage à la DHR 123. La moyenne ainsi que les écart-types pour les donneurs sains sont représentés. Les résultats ont été normalisés par rapport à la condition TNFα et sont exprimés en ratio de MFI. ns : non significatif ; * p < 0,05 ; ** p < 0,005.

Figure 12 : Le 4C3 et le r4C3 n'induisent pas d'augmentation de l'activité de la cathepsine G par les neutrophiles pré-activés.

A. Des neutrophiles purifiés provenant de huit donneurs sains indépendants ont été pré-activés avec du TNFα (2 ng/mL) pendant 15 minutes à 37°C (colonnes blanches) avant d'être incubés pendant 45 minutes avec du 4C3 (colonnes grises), des préparations d'IgG (non mélangées) provenant de deux donneurs sains (colonnes hachurées) ou de quatre patients GPA actifs au moment du diagnostic (colonnes quadrillées) ou des IgG provenant du patient P2 (lignes verticales). La dégranulation des neutrophiles a été évaluée par l'expression de CD63 représentée en pourcentage de cellules positives. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM obtenus dans huit expériences indépendantes, chaque cercle représentant une expérience. NS : non significatif ; * p < 0,05 ; ** p < 0,005 ; *** p < 0.0005. B. Des neutrophiles de donneurs sains ont été pré-activés par le TNFα à 2 ng/mL à 37°C durant 15 minutes (histogramme de gauche), puis ont été incubés durant 90 minutes à température ambiante avec l'AcMo 4C3 et l'AcMo r4C3 à 2 et 20 µg/mL ou avec le PMA-ICa. L'activité de la cathepsine G a été mesurée dans les surnageants d'activation des neutrophiles après ajout de son substrat et lecture par spectrofluorimétrie. Une expérience représentative de 3 est montrée. Les résultats sont exprimés en ΔRFU (*Relative Fluorescence Units*).

Figure 13 : Le 4C3 n'augmente pas le phénotype d'adhésion des neutrophiles humains.

A et **B**. Des neutrophiles purifiés provenant de huit donneurs sains indépendants ont été primés avec TNF α (2 ng/mL) pendant 15 minutes à 37°C (colonnes blanches) avant d'être incubés pendant 45 minutes avec du 4C3 (colonnes grises), des préparations d'IgG séparées (non mélangées) provenant de deux donneurs sains (colonnes hachurées) ou de quatre patients GPA actifs au moment du diagnostic (colonnes quadrillées) ou des IgG provenant du patient P2 (lignes verticales). Le critère d'adhésion des neutrophiles a été évalué en mesurant les expressions de surface des CD11b (**A**) et CD18 (**B**) par cytométrie de flux. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM obtenus dans huit expériences indépendantes chaque cercle

5

10

représentant une expérience. NS : non significatif ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0.0005$.

Figure 14 : Analyse par SDS – PAGE des différentes formes de 4C3 obtenues.

4C3 natif (puits 2), 4C3 recombinant (puits 3), 4C3 déglycosylé (puits 5) et 4C3 Fab (puits 6) en comparaison au 6H4 (puits 4 ; IgG1 anti-ovalbumine). Le puits de gauche (n°1) correspond au marqueur de poids moléculaire (PM) en kilo Dalton (kDa).

Figure 15 : Les dérivés du 4C3 n'augmentent pas l'expression de la PR3 et n'induisent pas la production de ROS par les neutrophiles pré-activés.

A. Des neutrophiles de donneurs sains ont été pré-activés par le TNF α à 2 ng/mL à 37°C durant 15 minutes puis ont été incubés pendant 90 minutes à température ambiante avec l'AcMo 4C3 et l'AcMo 6H4 à 40 μ g/mL ou avec le PMA-ICa ou en équivalent de mol pour le Fab et F(ab')₂. L'expression membranaire de la PR3 (mbPR3) a été analysée par cytométrie en flux après marquage avec l'anticorps 4C3-AF488. Une expérience représentative des 3 réalisées est montrée. **B**. La production de ROS a été mesurée en cinétique en présence des dérivés Fab, F(ab')₂ et Fc déglycosylé (dFc) de l'anticorps 4C3. $n = 1$.

15

20

Figure 16 : Le r4C3 n'augmente pas la production intracellulaire de ROS par les neutrophiles.

Des neutrophiles de donneurs sains ont été pré-activés par le TNF α (triangle), puis ont été incubés durant 90 minutes avec le r4C3 (rond, $n = 11$), le 4C3 (losange, $n = 20$) ou avec le PMA-ICa (triangle inversé). La production de ROS a été analysée par cytométrie en flux par mesure de la MFI après marquage à la DHR 123. La moyenne ainsi que les écart-types pour les donneurs sains sont représentés. Les résultats ont été normalisés par rapport à la condition TNF α et sont exprimés en ratio de MFI. NS : non significatif.

25

30

Figure 17 : Analyse en électrophorèse SDS – PAGE des différentes fractions obtenues après purification d'un sérum de patient GPA sur protéine G.

Sérum (puits 2), fraction non retenue (NR, puits 3), lavages (L, puits 4 à 9), éluions (E, puits 10 à 14). Les puits de gauche (n°1) et droite (n°15) correspondent au marqueur de poids moléculaire (PM) en kDa. Image représentative des 6 expériences réalisées.

Figure 18 : Les IgG purifiées du sérum de patient GPA contiennent des IgG anti-PR3 à la différence des IgG purifiées du sérum de donneur sain.

Les IgG contenues dans le sérum de donneurs sains et de patients GPA ont été purifiées puis le dosage des IgG anti-PR3 a été réalisé par ELISA à l'aide du kit EuroImmunTM. Les contrôles internes au kit (contrôle négatif / contrôle positif / calibrateur 20 UR/mL) ont été utilisés en comparaison avec l'AcMo 4C3 à 50 µg/mL et les sérums non purifiés. Une expérience représentative des 6 réalisées est montrée.

Figure 19 : Les IgG purifiées induisent une augmentation de la production intracellulaire de ROS par les neutrophiles de donneurs sains.

Des neutrophiles de donneurs sains ont été pré-activés par le TNFα à 2 ng/mL à 37°C durant 15 minutes (triangle), puis ont été incubés avec les IgG purifiées de patients GPA (rond, n = 32) ou de donneurs sains (losange, n = 16) à 200 µg/mL ou avec le 4C3 (triangle inversé, n = 20). La production de ROS a été analysée par cytométrie en flux par mesure de la MFI après marquage à la DHR 123. La moyenne ainsi que les écart-types sont représentés. Les résultats ont été normalisés par rapport à la condition TNFα et sont exprimés en ratio de MFI. ns : non significatif ; * p < 0,05 ; ** p < 0,005 ; *** p < 0,0005.

Figure 20 : Le 4C3 est capable d'inhiber la production intracellulaire de ROS des neutrophiles humains induite par la présence d'IgG GPA+.

Des neutrophiles de donneurs sains ont été incubés avec de la cytochélasine B (5 µg/mL) 5 minutes à 37°C puis du sodium azide (2 mM) et de la DHR (2,5 µM) ont été ajoutés 5 minutes à 37°C avant de pré-activer les neutrophiles avec du TNFα à 2 ng/mL à 37°C durant 15 minutes. A la fin de la pré-activation, les neutrophiles ont été incubés 15 minutes à 37°C avec l'AcMo 4C3 à 20 µg/mL avant d'ajouter pendant 35 minutes à 37°C des IgG issus de patients atteints de GPA à 200 µg/mL. La production de ROS a été analysée par cytométrie en flux par mesure de la MFI après marquage à la DHR 123. Les résultats obtenus avec 4 IgG de patients GPA sont représentés. Les résultats sont exprimés en MFI et le pourcentage d'inhibition induit par le 4C3 est indiqué. n = 4.

EXEMPLES / MATERIELS & METHODES / RESULTATS

1. SELECTION DU PATIENT

Avant obtention de l'anticorps 4C3, trois immortalisations ont été réalisées à partir de prélèvements sanguins de 3 patients différents atteints de la maladie de Wegener ou
5 *Granulomatosis With Polyangiitis* (GPA). Des clones ont pu être obtenus mais aucun n'a abouti à la production d'un anticorps pertinent. Les causes de ces échecs étant multiples : lymphopénie, thrombocytose, hyperleucocytose, il a été décidé d'adapter le procédé en ciblant plus spécifiquement les patients selon la clinique et la biologie, et en optimisant la technique d'immortalisation.

10 Le clone 4C3 est issu d'un patient atteint d'une granulomatose avec polyangéite (GPA) et suivi en consultation dans le service de pneumologie du Centre Hospitalier Régional et Universitaire (CHRU) de Tours. Ce patient a été diagnostiqué pour sa GPA en 2011 suite à des atteintes Oto-Rhino-Laryngologiques (ORL) et pulmonaires ainsi qu'une hémorragie alvéolaire. Ce patient a reçu un premier traitement de 6 mois avec de l'EndoxanTM suivi d'un
15 traitement à base de corticoïdes et de méthotrexate. Le dernier examen biologique au moment du prélèvement indiquait un taux de lymphocytes B circulants de $72/\text{mm}^3$ et un taux d'auto-anticorps dirigés contre la protéinase 3 (cANCA) supérieur à 177 UI/mL. Le patient a accepté de participer, après consentement éclairé, à une collection d'échantillons biologiques humains déclarés au Ministère de la Recherche (n°DC-2012-1636) conformément au décret
20 n°2007-1120 du 10 Août 2007. Après recueil des données cliniques et signature du consentement éclairé, le sang de ce patient a été prélevé sur ACD (anti-coagulant Citrate de Dextrose) puis acheminé *via* le laboratoire d'immunologie du CHRU de Tours vers la plateforme BCResources.

2. IMMORTALISATION DES LYMPHOCYTES B

25 Pour l'obtention de clones producteurs d'IgG anti-PR3 (expérience n°IM3-16), il a été utilisé un kit commercialisé par la société DendriticsTM (kit DDXK-HuBBBTM), lequel utilise la technique d'immortalisation EBV (Epstein Barr Virus). Néanmoins, le protocole recommandé par cette société a été optimisé par les inventeurs et est différent de celui décrit dans le kit. Normalement, le kit est utilisé sur des *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC) totaux
30 frais (issus d'un prélèvement sanguin du jour) et nécessite une première étape d'immortalisation puis des étapes de sous-clonages pour obtenir des cellules monoclonales. Pour l'obtention de l'anticorps 4C3, l'optimisation du kit a conduit à partir de PBMC

décongelés (et non frais), lesquels ont été ensuite enrichis par tri cellulaire avec des lymphocytes B (LB) mémoires autologues dans les puits de culture, *i.e.* qu'une nouvelle étape du protocole a été mise au point par les inventeurs. De plus et en conséquence de cette optimisation, les conditions de culture qui ont été mises en place ont également permis de
5 s'affranchir de l'étape de sous-clonage pourtant décrite comme indispensable dans le protocole du kit.

Plus précisément, pour l'enrichissement en lymphocytes B mémoires, deux étapes successives ont été réalisées : la première étape a permis d'isoler par sélection négative les lymphocytes B totaux (« *B-cell isolation kit II* » de chez Miltenyi BiotecTM, Réf 130-091-151) puis de trier
10 spécifiquement au trieur MoFloTM Astrios les lymphocytes B mémoires CD19⁺ CD27⁺. Différentes conditions de co-culture ont été testées en P96 fond plat : PBMC seuls, PBMC enrichis en LB mémoires, PBMC déplétés en LB et enrichis en LB mémoires avec différentes quantités de cellules. Lors de la seconde étape, les cellules ont été stimulées et immortalisées en présence de particules virales EBV à l'aide du kit commercialisé par DendriticsTM (kit
15 DDXK-HuBBBTM). Au cours des dix premiers jours de culture, la formation de clusters a été évaluée au microscope et les cellules ont été restimulées après 9 jours (J9) de culture.

3. SELECTION DES CLONES PAR ELISA

A partir de J20 de culture, l'identification par test ELISA des clones produisant des IgG a été commencée. Les surnageants positifs en IgG totales ont été répertoriés et les cultures de
20 clones correspondants ont été poursuivies. A l'inverse, les puits qui sont sortis deux fois négatifs ont été éliminés. Dans un premier temps, 62 clones ont été sélectionnés sur la base de leur production détectable d'IgG totales.

Ces clones positifs ont été de nouveau criblés par ELISA en présence de PR3 (Athens Research and TechnologyTM, référence 16-14-161820). Après *coating* des puits de la plaque
25 ELISA MaxiSorpTM (96 puits) avec 2 µg/mL de PR3 native pendant une nuit à 4°C, les puits ont été saturés en tampon PBS-BSA 4% (*Phosphate Buffer Saline - Bovine Serum Albumin*) afin d'empêcher une fixation non spécifique des anticorps sur le plastique du puits. Les surnageants de culture des lymphocytes B ont été incubés pendant 2 heures à 37°C avant d'ajouter l'anticorps secondaire à savoir, un anti-Fc IgG humain couplé à l'HRP
30 (*HorseRadish Peroxidase*). La révélation a été faite en présence de TMB (3,3',5,5'-TétraMéthylBenzidine), substrat de la peroxydase. La lecture de l'absorbance a été réalisée à une longueur d'onde de 620 nm. Le seuil de positivité a été fixé à une valeur d'absorbance deux fois supérieure au témoin négatif. Les cellules dont les surnageants sont

sortis positifs au moins trois fois en ELISA ont été amplifiées afin d'avoir suffisamment de cellules pour les tests ultérieurs. A l'inverse, les puits qui sont sortis négatifs deux fois consécutives ont été éliminés. Ainsi, seuls 5 clones se sont révélés positifs en ELISA anti-PR3. Les 5 clones ont été mis en expansion, re-testés en ELISA et les 3 meilleurs ont été gardés (*i.e.* 4C3, 4C5 et 5D11) (Figure 1A). Seul le 4C3 s'est révélé spécifique de la PR3, le 5D11 n'étant pas spécifique (Figure 1B) et le 4C5 ayant arrêté de produire des IgG.

4. CARACTERISATION DE L'ANTICORPS 4C3

Après confirmation de la spécificité de l'anticorps 4C3 (Figure 1B), il a été mis en évidence par ELISA (tests ELISA commercialisés) que cet anticorps anti-PR3 d'isotype IgG avait une sous-classe IgG1 et une chaîne kappa (Figure 1C et 1D). L'affinité du 4C3 pour la PR3 est élevée avec une constante de dissociation K_D de $7,41 \cdot 10^{-10}$ M (valeur obtenue par la technique BIACORE) (Figure 1E + Tableau 2 ci-dessous).

4C3							
Courbe	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K_D (M)	Rmax (RU)	Conc (M)	Chi ² (RU ²)	U-value
	1,26E+07	0,00936	7,41E-10			0,723	3
Cycle : 5				78,35	1,25E-09		
Cycle : 6				76,5	2,50E-09		
Cycle : 7				80,18	5,00E-09		
Cycle : 8				71,98	1,00E-08		
Cycle : 9				75,01	2,00E-08		

Tableau 2 : Affinité de l'anticorps 4C3

5. MISE EN PRODUCTION EN FLASQUE HAUTE DENSITE

Après une première caractérisation de l'anticorps sécrété dans les surnageants de culture, le clone 4C3 a été amplifié par passages successifs des cellules en puits P24 puis en puits P6 et enfin en flasques afin d'augmenter le nombre de cellules. La monoclonalité de ce clone a été confirmée par *Polymerase Chain Reaction* (PCR) par l'étude des réarrangements des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgH) (Figure 2A). Le clone 4C3 a alors été mis en production en flasque haute densité (CELLineTM WheatonTM) composées de deux compartiments séparés par une membrane semi-perméable qui laisse passer les protéines inférieures à 10 kDa. Le premier compartiment contient le milieu extracellulaire nutritif composé de DMEM additionné de pénicilline/streptomycine et de glutamine mais sans sérum de cheval tandis que le deuxième compartiment contient les cellules dans lequel a été récolté les anticorps produits tous les trois-quatre jours sur une période d'au moins 70 jours.

Deux productions ont été réalisées (expériences PRO 01-17 et PRO 02-18) pendant lesquelles le nombre de cellules (Figure 2B) ainsi que le niveau de production d'IgG anti-PR3 (Figure 2C) ont été vérifiés.

6. PURIFICATION DE L'ANTICORPS 4C3

5 L'ensemble des surnageants collectés a été filtré sur filtre 0,2 μm après centrifugation 10 minutes à 500 g. Les anticorps contenus dans les surnageants ont été purifiés par chromatographie d'affinité (HiTrapTM Protein A 1 mL GE HealthcareTM) sur l'appareil AKTATM (GE HealthcareTM). La pureté des différentes fractions a été contrôlée par électrophorèse sur gel 4-12% Bis-Tris et coloration au Bleu de Coomassie (Figure 2D). La
10 concentration finale de l'anticorps 4C3, après dosage BCATM, est de 5,974 mg/mL. La spécificité du 4C3 a été confirmée par ELISA en présence de PR3 native *coatée* (1 μg) (Figure 2E).

7. SPECIFICITE DU 4C3 SOUS SA FORME RECOMBINANTE

Afin de produire l'anticorps 4C3 sous forme recombinante (r4C3), les séquences des régions
15 variables spécifiques de la PR3 (séquences SEQ ID NOs : 6 et 24) ont été sous-clonées dans des vecteurs d'expression d'IgG recombinantes (vecteurs commercialisés). Les vecteurs d'expression ainsi construits ont été transfectés en cellules de mammifère HEK-293 (ATCC[®] CRL-1573TM) pour la production d'IgG monoclonales d'isotype IgG sous forme sécrétée dans le surnageant de culture. Après récolte de 50 mL de surnageant de culture, l'anticorps r4C3 a
20 été purifié comme précédemment décrit et a permis d'obtenir une concentration finale de r4C3 de 3,5 mg/mL.

Pour confirmer la spécificité de l'anticorps 4C3 recombinant, un test ELISA a été réalisé en présence de différentes quantités de PR3 *coatée* en comparaison avec le 4C3 (Figure 3A). Il a ainsi été montré que le r4C3 est capable de se lier à la PR3 de manière comparable au 4C3
25 (Figure 3A). Ce résultat a été confirmé par BIACORE puisque le r4C3 possède une affinité vis-à-vis de la PR3 comparable au 4C3 (Figure 3B + Tableau 3 ci-dessous).

r4C3							
Courbe	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K_D (M)	Rmax (RU)	Conc (M)	Chi² (RU²)	U-value
	1,37E+07	0,009358	6,84E-10			1,06	4
Cycle : 14				161,8	1,25E-09		
Cycle : 15				128,1	2,50E-09		
Cycle : 16				110,9	5,00E-09		
Cycle : 17				98,36	1,00E-08		
Cycle : 18				100,5	2,00E-08		

Tableau 3 : Affinité de l'anticorps r4C3

Les deux anticorps 4C3 et r4C3 partagent la même région variable de la chaîne lourde (séquences SEQ ID NOs : 6 à 19) et la même chaîne légère (séquences SEQ ID NOs : 20 à 5 35) mais diffèrent uniquement dans la région constante de la chaîne lourde par la mutation R > K en position 224 (ou AGA > AAA en position 670-672). Cette mutation confère un allotype différent à ces 2 anticorps à savoir G1m3-1 pour le 4C3 et G1m17-1 pour le r4C3.

8. IDENTIFICATION DE L'ÉPITOPE RECONNU PAR LE 4C3

Pour identifier l'épitope de la PR3 reconnu par le 4C3, il a été dans un premier temps réalisé 10 un *western blot* en condition non dénaturante et dénaturante. La protéinase 3 (native ou dénaturée) a été séparée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 4-12% Bis-Tris puis transférée sur membrane de nitrocellulose et saturée avec 5% de BSA dans du TBS 0,1% TweenTM 20 à température ambiante pendant une heure sous agitation. La membrane a ensuite été incubée avec le 4C3 (dilution 1/10 000^{ème}) une nuit à 4°C sous agitation. Pour révéler les 15 protéines, les membranes ont été incubées avec un anticorps secondaire anti-Fc humain couplé à la HRP et révélées avec le kit PierceTM ECL Plus (ThermoFisherTM). Il a ainsi été déterminé que le 4C3 reconnaît préférentiellement un épitope conformationnel de la PR3 avec observation d'un marquage moins intense de la PR3 en condition dénaturante (Figure 4A).

L'identification de l'épitope reconnu par l'anticorps 4C3 a été réalisée par la société 20 MabSilico. La première étape a permis de modéliser l'épitope de la PR3 par la méthode MabTope qui consiste en la prédiction informatique d'une liste ordonnée de peptides de la PR3 susceptibles d'appartenir à l'épitope à partir de la séquence de la partie variable (V_H et V_L) du 4C3 (Figure 4B et 4C). La deuxième étape a permis la mesure expérimentale de la liaison spécifique d'un certain nombre de ces peptides à l'anticorps. Cette mesure a été faite 25 par HTRF (*Homogeneous Time Resolved Fluorescence*) entre un anticorps anti-Fab couplé au d2 (CisBioTM) qui se lie à l'anticorps d'intérêt, et une streptavidine couplée au terbium

(CisBio™) qui se lie au peptide biotinylé (Figure 4D). Le peptide 4C3_3.2 (séquence SEQ ID NO : 40) a induit le ratio HTRF le plus important (Figure 4D) démontrant ainsi que l'épitope reconnu par le 4C3 est constitué d'une majorité de ces acides aminés (Figure 4E).

De plus, la liaison du 4C3 à la PR3 a été altérée en présence d'alpha 1 anti-trypsine (α 1AT), l'inhibiteur naturel de la PR3, capable d'induire un changement de conformation de la PR3 empêchant les Ac anti-PR3 reconnaissant l'épitope 1 de s'y fixer (Figure 4F).

Le 4C3 cible donc un épitope conformationnel de la PR3 proche de son site catalytique (acides aminés **en gras souligné**, Figure 4E) et du patch hydrophobe (acides aminés ***en gras italique***, Figure 4E) et sur une région chevauchant celle de l'épitope 1 de la PR3 (Figure 4B).

10 9. ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA PR3 EN PRESENCE DU 4C3

Pour mieux caractériser l'anticorps 4C3, l'activité enzymatique de la PR3 a été mesurée après incubation avec du 4C3 pendant 30 minutes à différents ratios (10 Ac : 1 PR3 / 5 Ac : 1 PR3 et 2 Ac : 1 PR3) et après ajout du substrat fluorescent commercial de la PR3 (Abz-VADnVADYQ-YNO2). Il a ainsi été mis en évidence que le 4C3 n'inhibe pas l'activité enzymatique de la PR3 dans ces conditions expérimentales tout comme le 6H4 qui est un anticorps non relevant, quel que soit le ratio utilisé (Figure 5). En effet, en présence de ces anticorps, le substrat a été dégradé (augmentation de la fluorescence) alors que l'ajout d'alpha 1 anti-trypsine (α 1AT) qui est un inhibiteur naturel de la PR3 n'a pas induit de dégradation du substrat de la PR3 (Figure 5).

20 10. MARQUAGE DE LA PR3 MEMBRANAIRE PAR CYTOMETRIE EN FLUX

La capacité de l'anticorps 4C3 à se lier à la PR3 a également été validée par cytométrie en flux. Pour cela, des neutrophiles ont été purifiés à partir du sang de donneurs sains de l'Etablissement Français du Sang (EFS) à l'aide d'un kit commercialisé (kit *Stem Cell, EasySep™ Direct Human Neutrophil Isolation* ; Kit référence 19666) (Figure 6A). Les neutrophiles non stimulés ont été incubés pendant 30 minutes à 4°C avec l'anticorps 4C3 préalablement couplé avec le fluorochrome AF488 (kit commercialisé ThermoFisher™). Plusieurs concentrations du 4C3 ont été testées (0, 1, 20 ou 100 μ g/mL) et ont permis de mettre en évidence un marquage plus intense de la PR3 à la surface des neutrophiles en fonction de la concentration d'anticorps couplé utilisé (Figure 6B). De plus, il a été précédemment décrit dans la littérature que le *priming* des neutrophiles avec du TNF alpha (TNF α) induisait une augmentation d'expression de la PR3 membranaire. Ceci a été confirmé par une augmentation du marquage avec le 4C3-AF488 après stimulation des neutrophiles

pendant 15 minutes à 37°C avec du TNF alpha (10 ng/mL) démontrant ainsi que l'Ac 4C3-AF488 reconnaît bien la PR3 (Figure 6C). Enfin, ce résultat a été renforcé par l'absence de marquage du 4C3-AF488 à la surface des lymphocytes (les lymphocytes n'exprimant pas de PR3 membranaire), un marquage intermédiaire sur les monocytes (PR3 faiblement exprimée) et un marquage très fort sur les neutrophiles (PR3 constitutivement exprimée) (Figure 6D).

11. MARQUAGE CYTOPLASMIQUE DU 4C3 DE TYPE cANCA

Des neutrophiles purifiés de donneurs sains ont été préalablement fixés au formol ou à l'éthanol puis ont été marqués avec l'Ac 4C3 couplé à l'AF488 et le DAPI (marquage nucléaire). L'analyse des lames au microscope à fluorescence a mis en évidence un marquage cytoplasmique diffus de type cANCA du 4C3 (Figure 7).

12. RECONNAISSANCE DE LA PR3 PAR LE 4C3 EN WESTERN BLOT

Pour confirmer la spécificité anti-PR3, le 4C3 a été utilisé comme anticorps primaire en *western blot* (Figure 8A et 8B) sur des lysats protéiques de neutrophiles, des cellules HeLa (ATCC® CCL-2™) et de la PR3 humaine. D'après la figure 8, le 4C3 a bien reconnu la PR3 humaine avec un marquage à la taille attendue, marquage également présent avec les neutrophiles et aucun marquage n'a été détecté dans les cellules HeLa, lesquelles n'expriment pas la PR3 (Figure 8A). De plus, le 4C3 n'a pas reconnu les autres protéases telles que l'élastase et la cathepsine G qui ont la même taille que la PR3 (Figure 8B). Ce résultat a donc confirmé le fait que l'anticorps 4C3 est spécifique de la PR3.

13. DEPLETION DES FRAGMENTS Fc DU 4C3

Dans le but de produire des anticorps anti-PR3 neutralisant l'interaction ANCA-PR3 et donc diminuant l'activation des neutrophiles au cours de la GPA, il a été testé différents fragments du 4C3 après déplétion des fragments Fc du 4C3, susceptibles d'activer les neutrophiles *via* l'interaction Fc/FcγR. Pour se faire, deux enzymes ont été utilisées : la pepsine et la papaïne. La pepsine est une enzyme protéolytique qui permet le clivage de l'anticorps juste en dessous des ponts disulfures qui relient les deux chaînes lourdes et d'obtenir un fragment F(ab')₂ (Tableau 4 ci-dessous). La papaïne est une protéase à cystéine capable de cliver l'anticorps au-dessus de la région charnière ce qui va donner deux fragments Fab distincts d'une part et des fragments Fc d'autre part (Tableau 5 ci-dessous).

DIGESTION DU 4C3 PAR LA PEPSINE

Piste	Echantillons	mg/mL
1	F(ab') ₂ (<i>Flowthrough</i> Protéine A)	0,259
2	F(ab') ₂ (<i>Flowthrough</i> Protéine A)	0,257
3	F(ab') ₂ (lavage Protéine A)	0,068
4	F(ab') ₂ (lavage Protéine A)	0,034
5	E1 Protéine A	0,051
6	E2 Protéine A	0,044
7	E2 Protéine A	0,051
8	4C3 purifié	5,9

Tableau 4 : Liste des échantillons déposés par piste**DIGESTION DU 4C3 PAR LA PAPAÏNE**

Piste	Echantillons	mg/mL
1	Fc (E1)	0,294
2	Fc (E2)	0,231
3	Fc (E3)	0,012
4	Fab (<i>Flowthrough</i> Protéine A)	0,542
5	Fab (lavage Protéine A)	0,166
6	E1 2 ^{ème} passage des Fab sur Protéine A	0,002
7	E2 2 ^{ème} passage sur Fab sur Protéine A	0,0027
8	E3 2 ^{ème} passage sur Fab sur Protéine A	0,044
9	4C3 purifié	5,9

Tableau 5 : Liste des échantillons déposés par piste

14. TESTS FONCTIONNELS SUR NEUTROPHILES

L'incubation d'ANCA avec des neutrophiles pré-activés par le TNF α conduit à la dégranulation, la production de ROS et à la formation de NET (*Neutrophil Extracellular Traps*) et donc à l'activation des neutrophiles. Afin de tester l'action neutralisante du 4C3 et de ses dérivés (r4C3, F(ab')₂, Fab, 4C3 déglycosylé...) sur les neutrophiles humains, différents tests fonctionnels *in vitro* ont été mis en place.

MATÉRIEL & MÉTHODES

14.1 Purification des IgG à partir du sérum

Pour les tests fonctionnels, nous avons sélectionné des sérums de patients atteints d'une maladie active selon les examens cliniques, le traitement et le niveau de PR3-ANCA. Les patients atteints d'une maladie active ont été diagnostiqués au Centre Hospitalier Universitaire de Tours. Nous avons purifié les IgG de cinq sérums de patients GPA indépendants pendant la phase active de la maladie après le diagnostic (IgG GPA) (*cf.* Tableau 6 ci-après) ou pendant la rémission pour le patient P2 (IgG P2) et de deux donneurs indépendants sains avec un kit à flux rapide de protéine G SepharoseTM 4 (GE HealthCare[®], USA). En bref, des sérums non mélangés ont été incubés avec de la protéine G pendant une heure à température ambiante avant élution. La filtration des échantillons a été effectuée à l'aide d'un système d'ultrafiltration Spin-X[®] UF Concentrator. Les IgG purifiées des sérums non mélangés ont été soumises à une électrophorèse sur un gel Bis-tris 4-12% avant d'être colorées au bleu de Coomassie. La présence de PR3-ANCA dans des préparations séparées d'IgG provenant de patients en phase active de la GPA et du patient P2 a été confirmée par ELISA à l'aide d'un kit EuroImmun anti-PR3, alors que les préparations séparées d'IgG purifiées provenant de donneurs sains ne contenaient pas de PR3-ANCA.

	GPA 1	GPA 2	GPA 3	GPA 4	GPA 5
Sexe	Homme	Homme	Homme	Homme	Homme
Age au diagnostic	68 ans	71 ans	79 ans	77 ans	53 ans
Atteintes	Rénale, neurologique et ORL	Articulaire et ORL	Rénale et articulaire	Pulmonaire et ORL	Rénale et pulmonaire
Type d'ANCA	cANCA	cANCA	cANCA	cANCA	cANCA
Niveau de PR3-ANCA	83 IU/mL	36 IU/mL	43 IU/mL	112 IU/mL	58 IU/mL

Tableau 6 : Principales caractéristiques des patients GPA actifs dont les IgG ont été purifiées pour induire une activation auto-immune des neutrophiles

14.2 Purification des neutrophiles et pré-activation par le TNF α

5 Les neutrophiles humains provenant de donneurs sains indépendants ont été purifiés par sélection magnétique négative avec le kit commercial "EasySep[®] Direct Human Neutrophil Isolation Kit" (StemCells[®], Canada) en suivant les instructions du fabricant. À la fin de l'isolement, les neutrophiles ont été mis en suspension dans une solution HBSS sans calcium ni magnésium. La pureté des neutrophiles isolés était > 95%, après évaluation par cytométrie en flux (CD15-PE et *Live dead*, Miltenyi Biotec[®], Allemagne). Les cellules ont été pré-activées avec du TNF α (Sigma-Aldrich[®], États-Unis) à une concentration finale de 2 ng/mL pendant 15 minutes à 37°C dans un bain d'eau.

14.3 Évaluation de la production de ROS par les neutrophiles

15 L'activation des neutrophiles provenant de donneurs sains indépendants a été évaluée par la production de ROS à l'aide d'un test à la dihydrorhodamine 123 (DHR 123). Des neutrophiles purifiés ont été mis en suspension dans du HBSS avec 1 mM de Ca²⁺ et 1 mM de Mg²⁺ et incubés avec 5 μ g/mL de cytochalasin B (Cayman Chemical[®], USA) pour augmenter la production de radicaux d'oxygène, pendant 5 minutes à 37°C. Les cellules ont ensuite été

chargées avec 2 μ M de DHR 123 et 2 mM d'azide de sodium (NaN_3) pendant 5 minutes à 37°C sous agitation. Les neutrophiles amorcés ont été incubés avec du 4C3 (2 à 100 μ g/mL), du r4C3 ou des préparations d'IgG séparées provenant de deux donneurs sains et de quatre patients GPA actifs (200 μ g/mL) pendant 45 minutes à 37°C. Un anticorps non pertinent (6H4, IgG1 κ , anti-ovalbumine) a été utilisé comme témoin négatif. Une combinaison d'acétate de myristate de phorbol (PMA, 50 ng/mL) et d'ionophore de calcium (ICa, 10 μ M), tous deux de puissants activateurs de neutrophiles, a été utilisée comme témoin positif de l'activation des neutrophiles. La réaction a été arrêtée avec de l'EDTA PBS glacé (1 mM) avant la mesure de la fluorescence de la DHR 123 par cytométrie de flux. Pour les expériences de neutralisation, des neutrophiles *primés* prétraités ont d'abord été incubés avec du 4C3 (20 μ g/mL) pendant 15 minutes à 37°C, puis des préparations séparées d'IgG de cinq patients actifs au moment du diagnostic de la GPA (IgG GPA, 200 μ g/mL) ont été ajoutées pendant 45 minutes supplémentaires.

14.4 Dégranulation et adhésion des neutrophiles

Les neutrophiles ont été pré-activés avec du $\text{TNF}\alpha$ et stimulés avec du 4C3 (2 et 20 μ g/mL), du r4C3 (2 et 20 μ g/mL), des IgG de patients atteints de GPA (200 μ g/mL) ou de la PMA-ICa pendant 45 minutes à 37°C. Après incubation, les cellules ont été lavées et marquées avec le CD63 couplé au FITC (dégranulation) ou marquées avec les anticorps CD11b VioBlue / CD18 FITC (BD Biosciences[®], USA) (phénotype d'adhésion) pendant 20 minutes à 4°C avant d'être analysées par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules positives et l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) ont été déterminés à l'aide du logiciel FlowJo[®]. La dégranulation des neutrophiles a également été évaluée par libération de CatG. Les surnageants ont été récoltés et incubés avec un substrat fluorescent de cathepsine G (ABZ-TPFSGQ-YNO2 de GeneCust[®]) (Attucci S, *et al. Measurement of free and membrane-bound cathepsin G in human neutrophils using new sensitive fluorogenic substrates*. *Biochem J.* 2002 Sep 15;366(Pt 3):965-70. doi: 10.1042/BJ20020321. PMID: 12088507; PMCID: PMC1222843) pendant 30 minutes avant la lecture de la fluorescence par spectrofluorimétrie à 420 nm. Les résultats sont exprimés sous la forme d'un rapport de Δ RFU par rapport à l'état normalisé de $\text{TNF}\alpha$ (dégranulation basale).

30 RÉSULTATS

Le premier test a consisté à évaluer l'expression de la PR3 membranaire après incubation des neutrophiles avec le 4C3 (Figure 9). L'anticorps 6H4 qui est un anticorps non relevant a été

utilisé en comparaison dans les différents tests et la solution PMA – Ionomycine calcium (PMA-ICa) a été utilisée comme contrôle positif d'activation des neutrophiles. Les neutrophiles humains purifiés ont été pré-activés avec du TNF α pendant 15 minutes à 37°C avant d'être incubés pendant 1h30 avec différentes concentrations d'anticorps 6H4 et 4C3 (2, 5 20 et 100 μ g/mL). A la fin de l'incubation, l'expression de la PR3 membranaire a été analysée par cytométrie en flux avec l'anticorps WGM2 (anticorps murin anti-PR3 humaine) (Figure 9). Les résultats ont montré que l'incubation des neutrophiles avec des doses croissantes de 4C3 conduit à une augmentation de l'expression de la PR3 à la surface des neutrophiles tandis que l'incubation avec du 6H4, quelle que soit la dose, a peu voire pas d'effet (Figure 9). Le 10 résultat a été identique, que la PR3 soit révélée avec un anticorps commercialisé ou avec le 4C3-AF488.

Le deuxième test fonctionnel qui a été étudié est la production de ROS, laquelle a été évaluée par le marquage DHR123-FITC par cytométrie en flux (Figures 10 et 11). Pour ces expériences, des IgG totales issues de donneurs sains ou de patients atteints de GPA ont 15 également été purifiées. Ici, le 4C3 n'a pas été capable d'induire la production de ROS alors que des préparations séparées d'IgG de patients atteints de GPA en phase active de la maladie (IgG GPA) ont conduit à une augmentation significative de la production de ROS. Au contraire, des préparations séparées d'IgG de donneurs sains (IgG HD), obtenues et utilisées dans les mêmes conditions, n'ont pas induit une forte production de ROS par les neutrophiles 20 pré-activées (Figure 10). Il est intéressant de noter que la stimulation des neutrophiles par des IgG purifiées provenant du patient P2 n'a pas induit une production significative de ROS par rapport aux IgG GPA purifiées provenant de patients GPA au moment du diagnostic (Figure 10). De plus, à la dose de 2 μ g/mL, le 4C3 comme le 6H4 n'induit pas d'augmentation significative de production de ROS par les neutrophiles. En augmentant la dose à 20 et 100 25 μ g/mL, il n'a pas été observé non plus d'augmentation significative de cette production de ROS par les neutrophiles démontrant ainsi que l'anticorps 4C3 sous sa forme entière n'est pas un anticorps activateur (Figure 11).

Le troisième test a consisté à analyser la dégranulation des neutrophiles en mesurant l'expression du CD63 à la membrane du neutrophile et l'activité de la cathepsine G dans le 30 surnageant des neutrophiles après incubation avec les anticorps (Figure 12). Le résultat précédemment obtenu a été confirmé puisqu'il a été mis en évidence de manière réciproque une absence de l'expression du CD63 (Figure 12A) et une absence de libération de cathepsine G en présence du 4C3 ou du r4C3 à la dose de 2 et 20 μ g/mL (Figure 12B).

Le quatrième test a consisté à analyser l'expression du CD11b et du CD18 (complexe Mac1) dans le but d'explorer le phénotype d'adhésion des neutrophiles après une stimulation avec le 4C3 (Figure 13). La présence de 4C3 n'a pas induit d'augmentation de l'expression de surface des CD11b / CD18 alors que les préparations d'IgG non mélangées provenant de donneurs sains ou de patients atteints de GPA au moment du diagnostic ont induit une régulation à la hausse significative de ces deux marqueurs d'adhésion (Figure 13A et 13B). Il convient de noter que les IgG du patient P2 ont induit un phénotype d'adhésion intermédiaire (Figures 13A et 13B).

L'ensemble de ces résultats, obtenus par des tests fonctionnels sur les neutrophiles, a démontré que les anticorps 4C3 et r4C3 n'activent pas les neutrophiles humains.

En parallèle de ces résultats, l'effet des dérivés du 4C3 a également été étudié. Avant de tester leur fonctionnalité sur des neutrophiles, la qualité de ces formes dérivées a été vérifiée par gel SDS-PAGE et coloration au Bleu de Coomassie (Figure 14). Il a été observé pour le 4C3 natif, le 6H4 et le r4C3 une seule bande de migration autour du poids moléculaire de 150 kDa correspondant habituellement au poids moléculaire d'une IgG1 (puits 2 à 4, Figure 14). La qualité et la pureté semblent identiques entre le 4C3, le r4C3 et le 6H4. Le dépôt du fragment Fab a révélé plusieurs bandes : deux bandes autour de 50 kDa, l'une correspondant au fragment Fab et l'autre au fragment Fc qui n'a pas été complètement éliminé après purification sur résine couplée à la protéine A et une troisième bande autour de 25 kDa correspondant au Fab réduit (6^{ème} puits, Figure 14). Le dépôt de la forme déglycosylée a révélé deux bandes : l'une un peu en dessous de 150 kDa correspondant à une IgG1 qui a perdu son site de glycosylation et l'autre autour de 50 kDa correspondant au fragment Fc (5^{ème} puits, Figure 14).

L'expression de la PR3 (Figure 15A) et le profil d'activation des neutrophiles (Figure 15B et 16) en présence de ces formes dérivées ont été étudiés. Il n'a été pas observé d'augmentation d'expression de la PR3 membranaire après incubation des neutrophiles avec les fragments Fab et F(ab')₂ du 4C3 contrairement au 4C3 sous sa forme entière (Figure 15A). De plus, les fragments F(ab')₂, Fab et le Fc déglycosylé (4C3 dFc) n'ont pas induit de production de ROS par les neutrophiles à la dose de 20 µg/mL (Figure 15B).

De manière tout à fait intéressante, il a été mis en évidence que le r4C3 sous sa forme entière n'est pas capable d'induire d'augmentation significative de la production de ROS et que cette production est au même niveau que celle induite par le TNFα : moyenne du ration MFI de la

condition $r4C3 = 0,96 \pm 0,09$ *versus* moyenne du ratio de la condition $4C3 = 1,48 \pm 0,26$ ($p = 0,0016$) (Figure 16), ce qui correspond à 0% d'augmentation d'activation avec le r4C3.

Au vu de ces résultats et dans l'optique d'obtenir un effet neutralisant de l'interaction cANCA/PR3, le 4C3 natif et/ou recombinant sous leur forme entière sont les plus intéressants.

15. TESTS DE NEUTRALISATION AVEC LE 4C3

Pour évaluer le potentiel bloquant de cet anticorps (*i.e.* 4C3) sur l'activation des neutrophiles induite par les ANCA (auto-anticorps anti-PR3), différentes stratégies ont été mises en place :

- des tests fonctionnels ont été réalisés sur des neutrophiles avant et après incubation avec l'anticorps entier ou avec ses dérivés (Fab, $F(ab')_2$, Fc déglycosylé...) ; et
- un effet dose a été évalué et différentes cinétiques d'incubation ont été testées.

Pour mettre au point ces expériences de neutralisation de cANCA, il a été décidé d'utiliser des sérums de donneurs sains (prélèvements sanguins obtenus auprès de l'EFS) et de sérums de patients GPA (sérums obtenus après anonymisation dans le laboratoire d'immunologie du CHRU de Tours) afin d'en purifier les IgG et notamment les IgG anti-PR3 (cANCA) des patients GPA. A la suite de l'étape de purification sur protéine G des sérums humains, les différentes fractions obtenues (non retenu, lavages et éluions) ont été déposées sur gel SDS-PAGE afin de vérifier leur qualité et leur pureté en comparaison avec le sérum d'origine (Figure 17). Ceci a confirmé que l'étape de purification des sérums sur protéine G a permis d'obtenir des IgG avec la présence d'une bande majoritaire à 150 kDa (Figure 17) alors que les fractions de lavages contiennent d'autres protéines comme l'albumine (bande à 50 kDa).

Après avoir réussi à purifier des IgG totales à partir des sérums, il a été vérifié que parmi les IgG purifiées de patients GPA, des IgG anti-PR3 type cANCA étaient présentes. Par ELISA, il a été mis en évidence que les lots d'IgG purifiées issues des sérums de patient GPA contenaient au moins 20 UR (Unité Relative)/mL d'IgG anti-PR3 (histogrammes gris clairs, avant et après purification, Figure 18) en comparaison avec le calibrateur (cal), le 4C3 et le contrôle positif (histogrammes gris foncés, Figure 18). Par ailleurs, il n'a pas été détecté, avec cette technique, d'IgG anti-PR3 dans les lots d'IgG purifiées issues des sérums de donneurs sains (histogrammes noirs, avant et après purification, Figure 18). Bien que ce dosage semi-quantitatif ait permis de confirmer la présence d'IgG anti-PR3 parmi les IgG purifiées de patients GPA (une expérience représentative de 6 lots est montrée), il n'a toutefois pas permis d'en connaître la proportion réelle.

Les IgG purifiées ont été utilisées à 200 µg/mL comme décrit dans la littérature. La fonctionnalité des IgG purifiées a été évaluée sur leur capacité à induire la production de ROS sur des neutrophiles humains de donneurs sains pré-activés par le TNF α (comme précédemment) et après 45 minutes d'incubation. Les IgG purifiées de patients GPA ont induit, de manière significative ($p = 0,0002$; $n = 32$), une plus grande production de ROS (moyenne ratio de MFI = $4,54 \pm 4,73$) que les IgG purifiées de donneurs sains (moyenne ratio MFI = $1,79 \pm 1,49$) (Figure 19). De plus, les IgG purifiées de patients GPA et les IgG purifiées de donneurs sains ont induit une production de ROS significativement plus importante que pour la condition TNF α et la condition 4C3 (Figure 19). Ce résultat a donc démontré que les IgG purifiées de patients GPA peuvent être utilisées comme activateur des neutrophiles afin de tester le potentiel pouvoir neutralisant du 4C3 et des autres dérivés.

Afin de tester l'action neutralisante du 4C3 sur la production de ROS, il a été choisi d'incuber dans un premier temps les neutrophiles avec le 4C3 pendant 15 minutes puis d'ajouter pendant 45 minutes supplémentaires les IgG purifiées de patients GPA. La production de ROS a ensuite été analysée comme décrit précédemment. Il a ainsi été mis en évidence que l'anticorps 4C3 à une concentration de 20 µg/mL n'active pas les neutrophiles lorsqu'il est utilisé seul et de manière tout à fait inattendu, l'anticorps 4C3 seul est également capable d'inhiber l'activation des ROS induite par la présence des IgG de patients GPA (Figure 20). En effet, il a été observé des pourcentages d'inhibition allant de 36% à 71% (moyenne de 51% de neutralisation sur 4 expérimentations distinctes), laquelle pourrait être améliorée en augmentant les quantités de 4C3 et/ou en modifiant les cinétiques d'incubation.

REVENDICATIONS

1. Anticorps monoclonal dirigé contre la protéinase 3 du neutrophile représentée par la séquence SEQ ID NO : 1,

ledit anticorps monoclonal :

- 5
- étant spécifiquement dirigé contre un épitope conformationnel de ladite protéinase 3 du neutrophile ; et
 - étant capable d'inhiber d'au moins 30% la production de dérivés réactifs de l'oxygène par des neutrophiles,
- ladite production de dérivés réactifs de l'oxygène étant induite par la présence
- 10 d'auto-anticorps dirigés contre ladite protéinase 3 du neutrophile.

2. Anticorps monoclonal selon la revendication 1 comprenant :

- une chaîne lourde comprenant de son extrémité N-terminale à son extrémité C-terminale :

15 - un CDR1 ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 15 ;

- un CDR2 ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 17 ; et

20 - un CDR3 ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 19 ;

et

- une chaîne légère comprenant de son extrémité N-terminale à son extrémité C-terminale :

25 - un CDR1 ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 31 ;

- un CDR2 ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 33 ; et

30 - un CDR3 ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 35,

en particulier comprenant :

- une chaîne lourde comprenant une région variable ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 7, étant entendu que ladite région variable de la

chaîne lourde comprend de son extrémité N-terminale à son extrémité C-terminale :

- le CDR1 de séquence SEQ ID NO : 15 ;
- le CDR2 de séquence SEQ ID NO : 17 ; et
- le CDR3 de séquence SEQ ID NO : 19 ;

et

- une chaîne légère comprenant une région variable ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 25, étant entendu que ladite région variable de la chaîne légère comprend de son extrémité N-terminale à son extrémité C-terminale :

- le CDR1 de séquence SEQ ID NO : 31 ;
- le CDR2 de séquence SEQ ID NO : 33 ; et
- le CDR3 de séquence SEQ ID NO : 35,

et de préférence comprenant :

- une chaîne lourde comprenant ou constituée d'une séquence ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 3, étant entendu que ladite chaîne lourde comprend la région variable de séquence SEQ ID NO : 7 ;
- et
- une chaîne légère comprenant ou constituée d'une séquence ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 21, étant entendu que ladite chaîne lourde comprend la région variable de séquence SEQ ID NO : 25.

3. Fragment d'un anticorps monoclonal selon la revendication 1 ou 2, ledit fragment étant choisi parmi le groupe de fragments constitué de : Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂, « *diabodies* ».

4. Acide nucléique comprenant ou constitué d'une séquence codant :

- l'anticorps monoclonal selon la revendication 1 ; ou
- la chaîne lourde d'un anticorps monoclonal selon la revendication 2 et/ou la chaîne légère d'un anticorps monoclonal selon la revendication 2 ; ou
- le fragment selon la revendication 3.

5. Vecteur d'expression comprenant au moins un acide nucléique selon la revendication 4, ledit acide nucléique étant sous contrôle d'éléments permettant son expression.
6. Cellule hôte ou lignée cellulaire transformée par un acide nucléique selon la revendication 4 et/ou un vecteur d'expression selon la revendication 5.
7. Anticorps monoclonal selon la revendication 1 ou 2 et/ou fragment selon la revendication 3 et/ou acide nucléique selon la revendication 4 et/ou vecteur d'expression selon la revendication 5 pour son utilisation comme médicament.
- 10
8. Composition pharmaceutique comprenant comme substance active au moins :
- un anticorps monoclonal selon la revendication 1 ou 2 ; et/ou
 - un fragment selon la revendication 3 ; et/ou
 - un acide nucléique selon la revendication 4 ; et/ou
 - un vecteur d'expression selon la revendication 5,
- 15 en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable, en particulier,
- ledit anticorps monoclonal selon la revendication 1 ou 2 étant à une dose comprise de 5 mg à 1 000 mg ; et/ou
 - ledit fragment selon la revendication 3 étant à une dose comprise de 5 mg à 1 000 mg ; et/ou
 - ledit acide nucléique selon la revendication 4 étant à une dose comprise de 5 mg à 1 000 mg ; et/ou
 - ledit vecteur d'expression selon la revendication 5 étant à une dose comprise de
- 20
- 25 5 mg à 1 000 mg.
9. Composition pharmaceutique selon la revendication 8 pour son utilisation dans le traitement précoce et/ou la prévention de rechute des poussées de granulomatose avec polyangéite.

10. Composition pharmaceutique pour son utilisation selon la revendication 9, ladite composition étant formulée pour être administrée par l'une des voies suivantes : orale, parentérale, injectable, topique, par inhalation, sous-cutanée, nasale ou pulmonaire.

5 11. Complexe immun anticorps/antigène, dans lequel :

- ledit anticorps est l'anticorps monoclonal selon la revendication 1 ou 2 ou un fragment selon la revendication 3 ; et
- l'antigène est la protéinase 3 du neutrophile représentée par la séquence SEQ ID NO : 1.

10

12. Kit de diagnostic permettant le dosage de la concentration sanguine de la protéinase 3 du neutrophile, ledit kit de diagnostic comprenant un anticorps monoclonal selon la revendication 1 ou 2 ou un fragment selon la revendication 3.

15 13. Méthode de diagnostic *in vitro* comprenant une étape de détermination du complexe immun anticorps/antigène selon la revendication 11 à l'aide d'un anticorps monoclonal selon la revendication 1 ou 2 ou un fragment selon la revendication 3, ledit dosage permettant de déterminer le degré de sévérité et/ou le risque de rechute de poussées de la granulomatose avec polyangéite chez un patient.

20

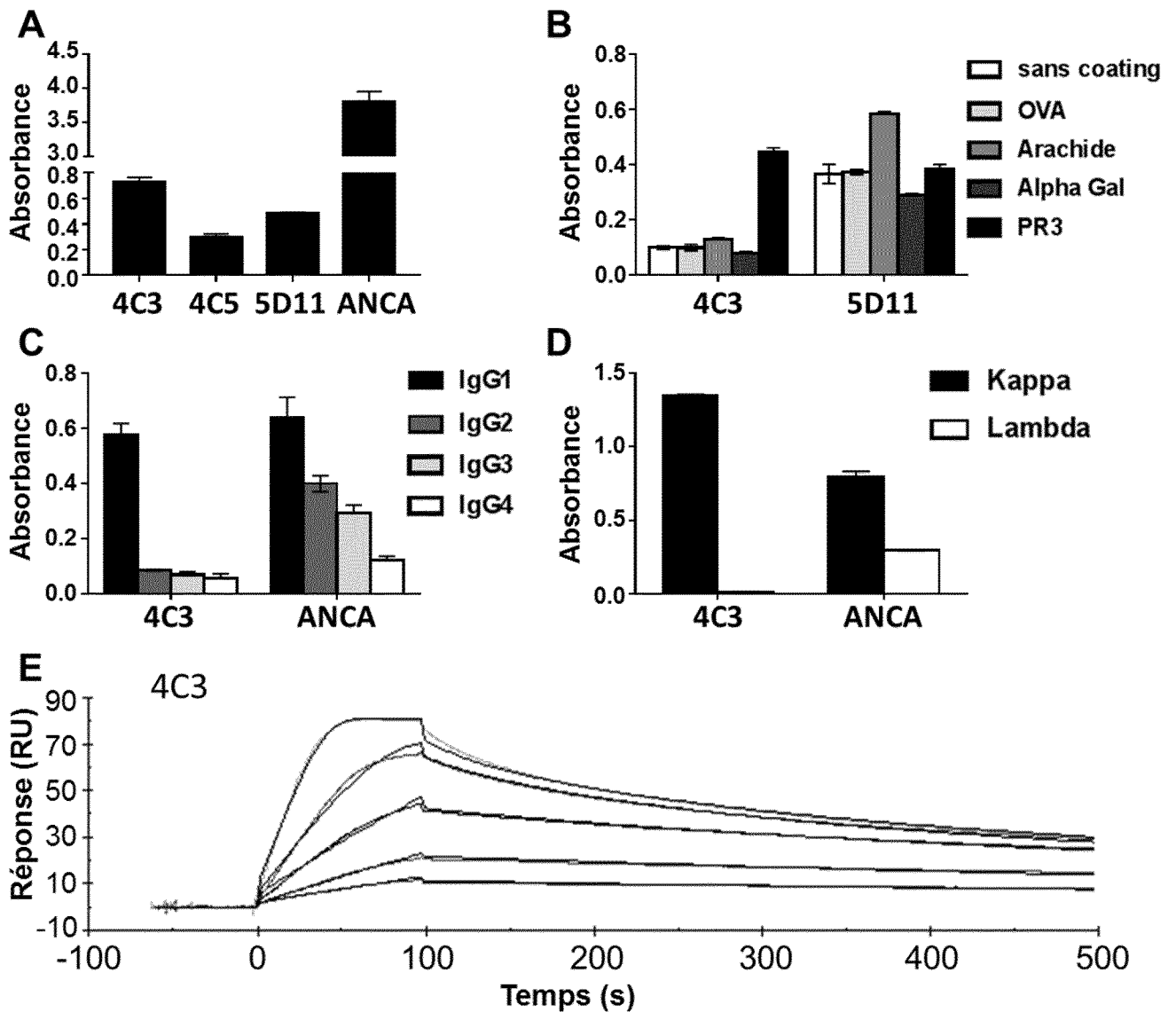


FIGURE 1

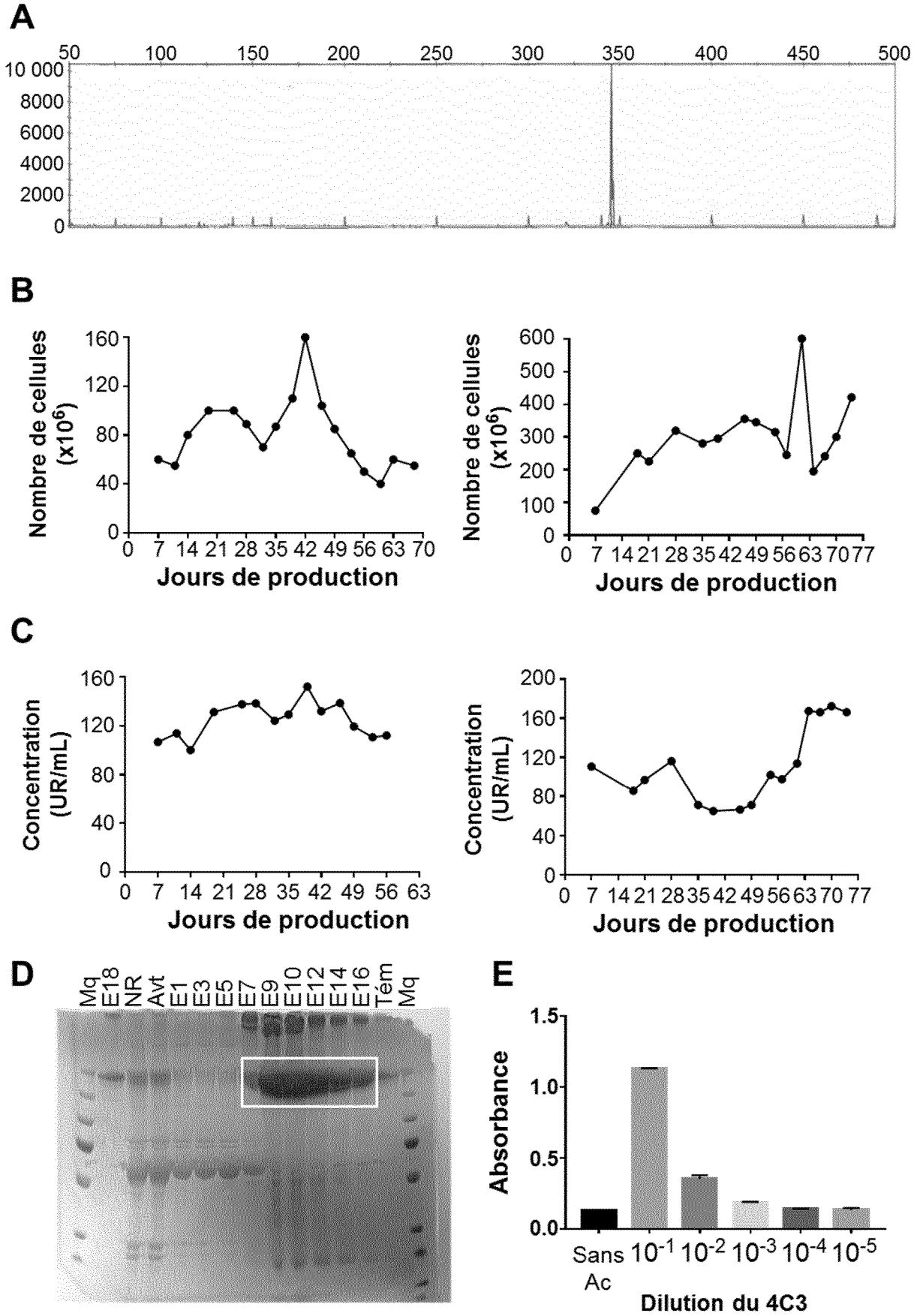
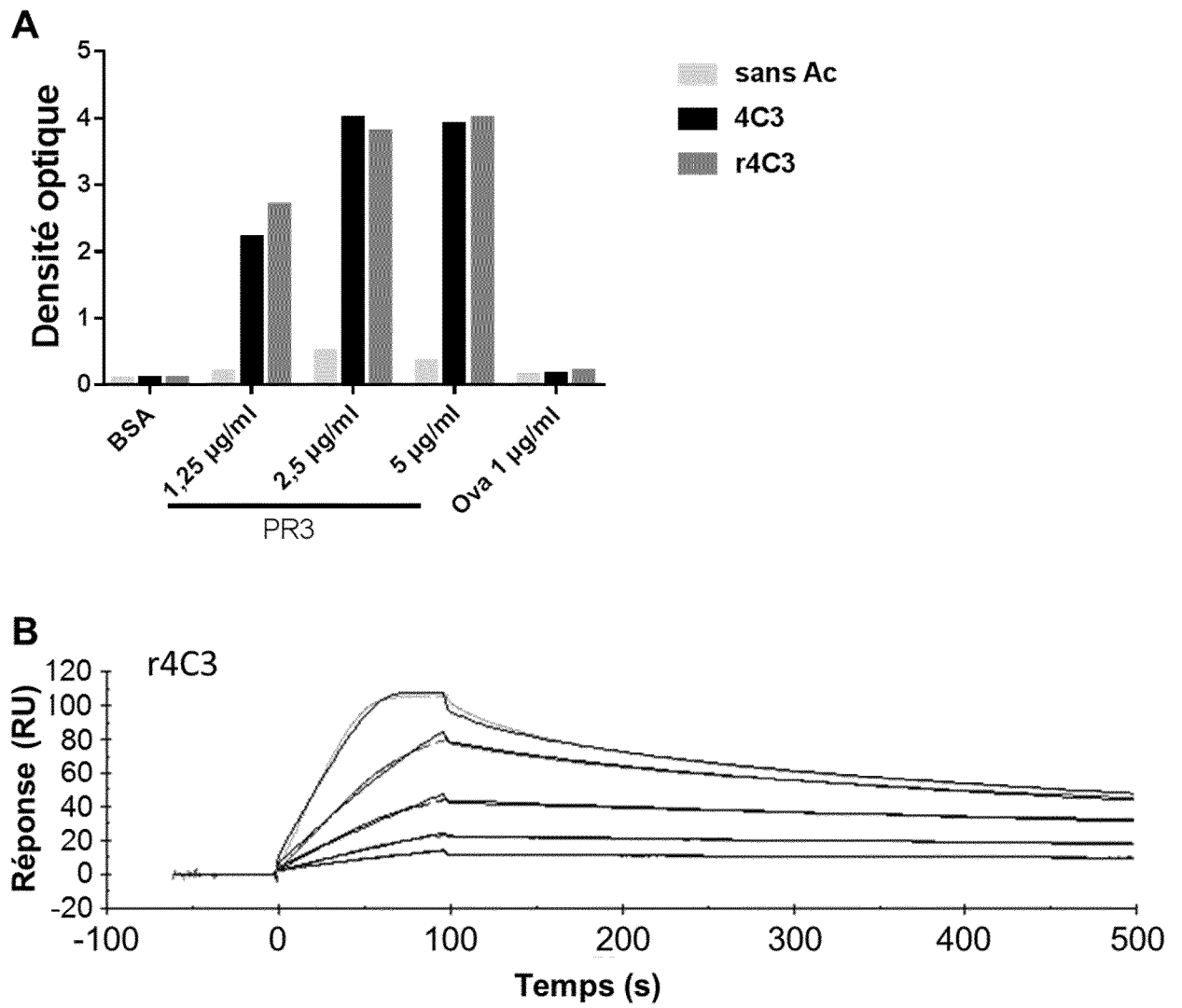
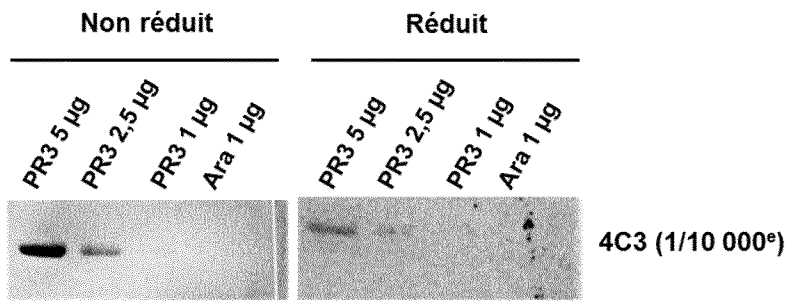


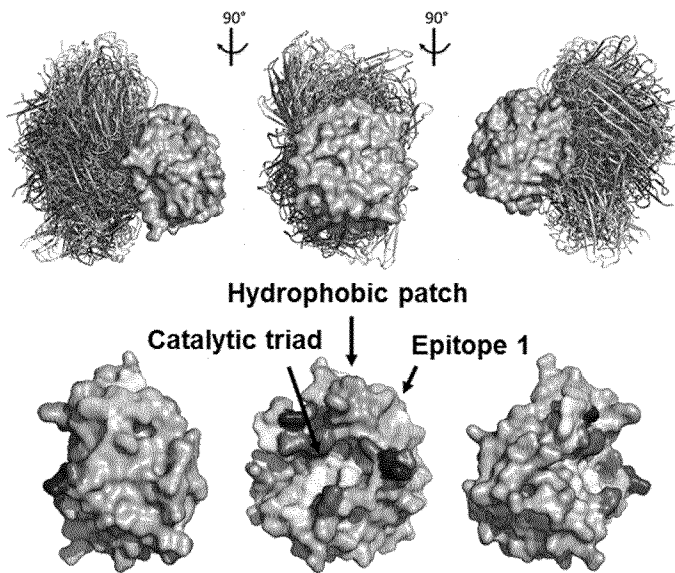
FIGURE 2



A



B



C

```

1  IVGGHEAQPH SRPYMASLQM RGNPGSHFCG GTLIHPSFVL TAAHCLRDIP
51  QRLVNVVLGA HNVRTQEPTQ QHFSVAQVFL NNYDAENKLN DVLLIQLSSP
101 ANLSASVATV QLPQQDQVPV HGTQCLAMGW GRVGAHDPPA QVLQELNVTV
151 VTFFCRPHNI CTFVPRRKAG ICFGDSGGPL ICDGIIQGID SFVWGCATR
201 LEPDFFTRVA LYVDWIRSTL R
    
```

PEPTIDE DE VALIDATION

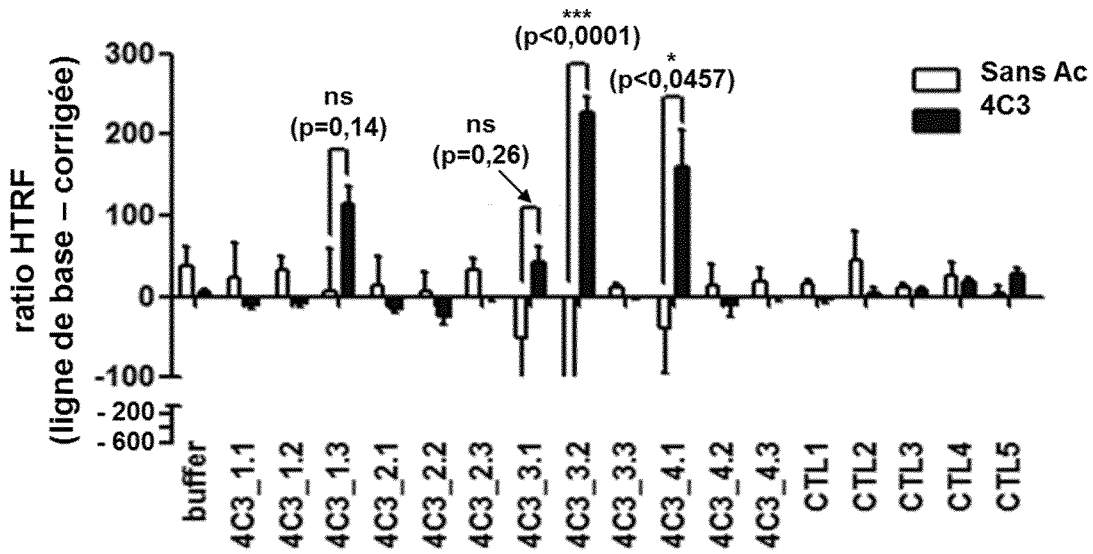
- Peptide 1
- — — — Peptide 2
- · — — Peptide 3
- · · — Peptide 4

RESIDUS DE L'ÉPITOPE

- X Hautement très probable
- X Hautement probable
- X Probable
- X Possible

FIGURE 4 (1/3)

D



E

RHRPPSPALASVLLALLLSGAARAAEIVGGHEAQPHSRPYMASLQMRGN
 PGSHFCGGTLIHPSFVLTAAHCLRDIPQRLVNVVLGAHNVRTQEPTQQH
 FSVAQVFLNNYDAENKLNDVLLIQLSSPANLSASVATVQLPQQDQPVPH
GTQCLAMGWGRVGAHDPPAQVLQELNVTVVTF**FF**CRPHNICTFVPRRKAG
 ICFGDSGGPLICDGI IQGIDSFV **IW**GCATR **LF**PDDFFTRVALYVDWIRST
 LRRVEAKGP

FIGURE 4 (2/3)

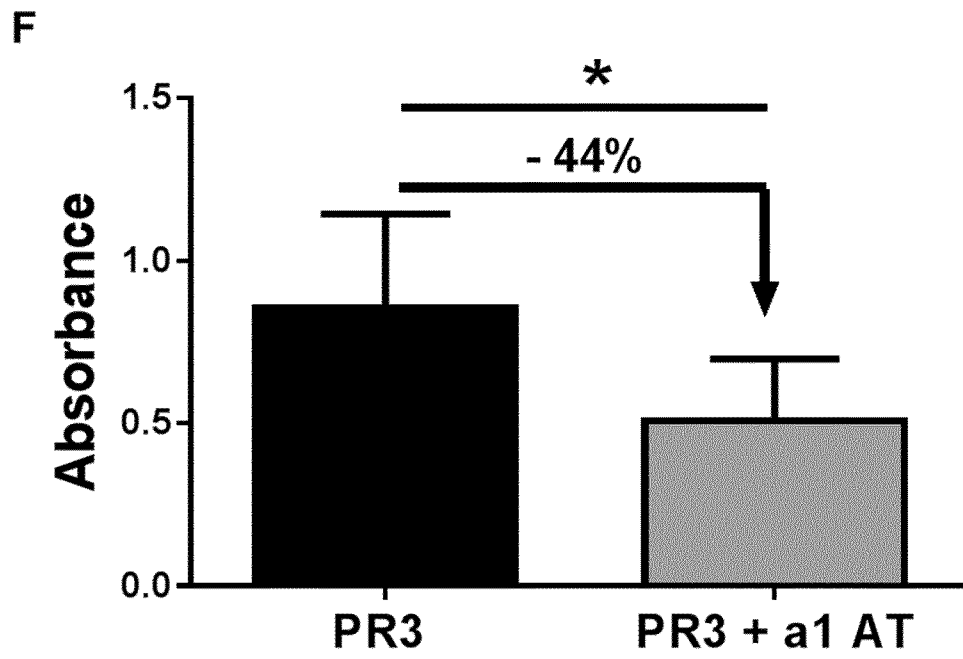


FIGURE 4 (3/3)

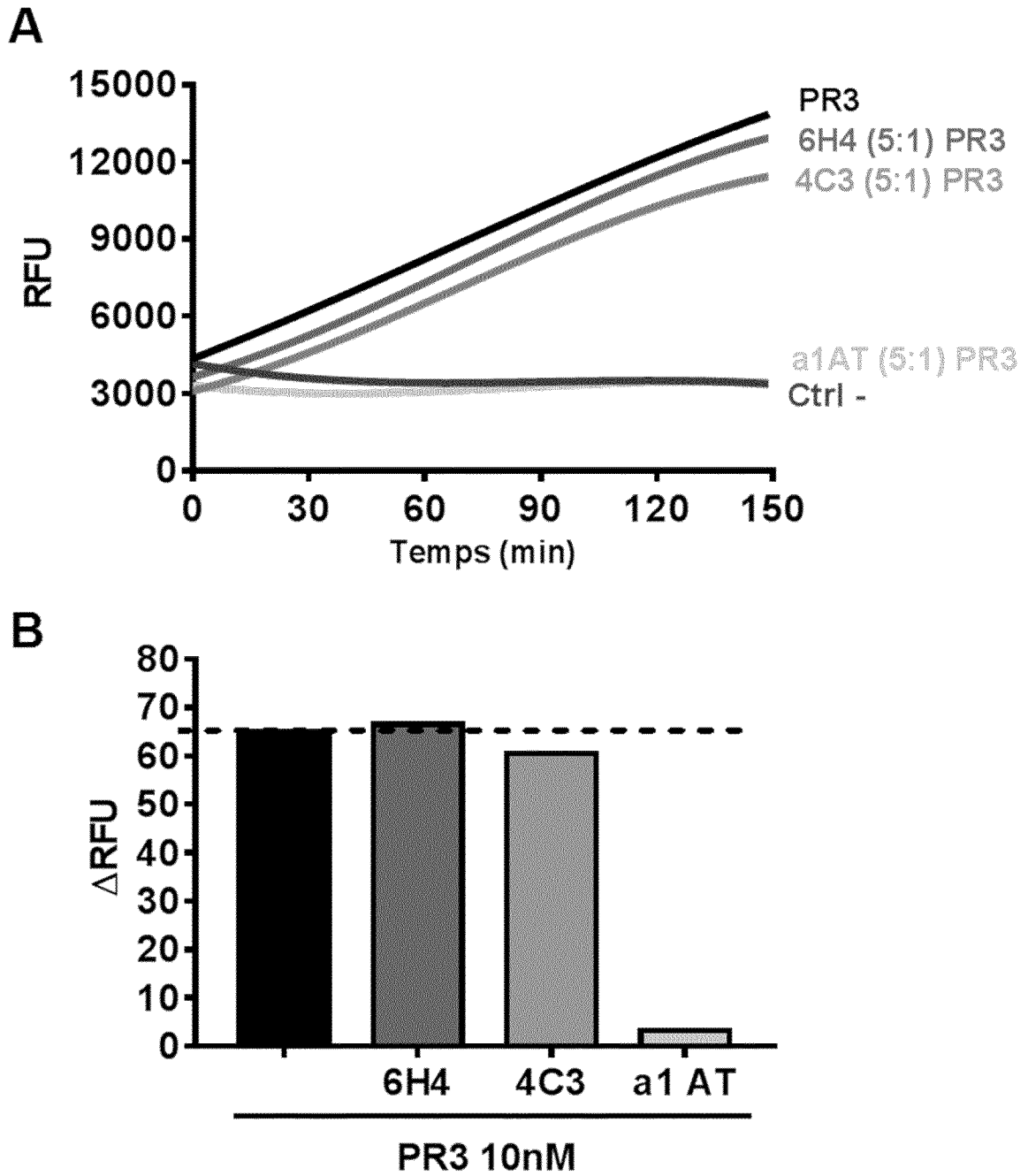


FIGURE 5

A

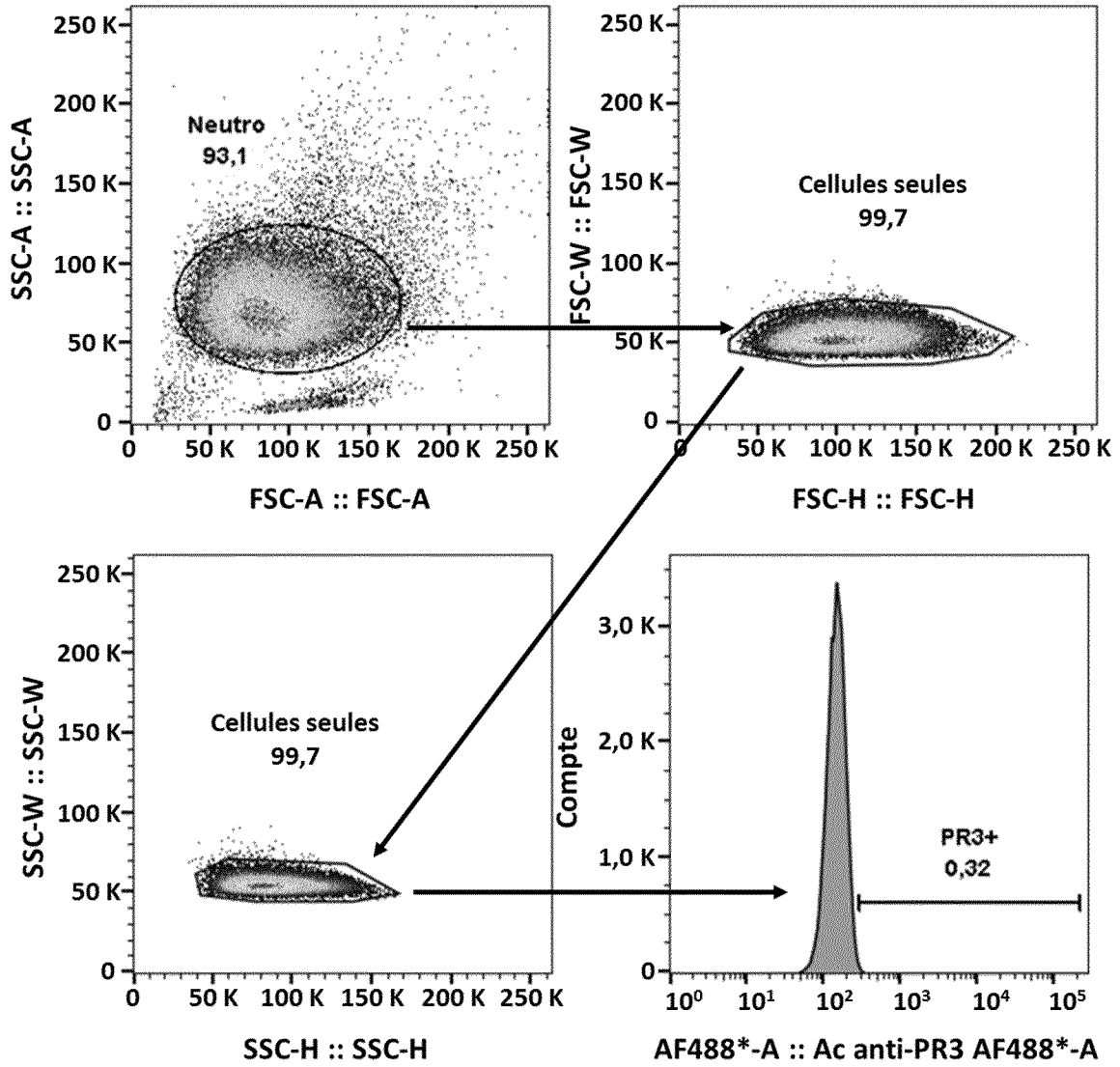
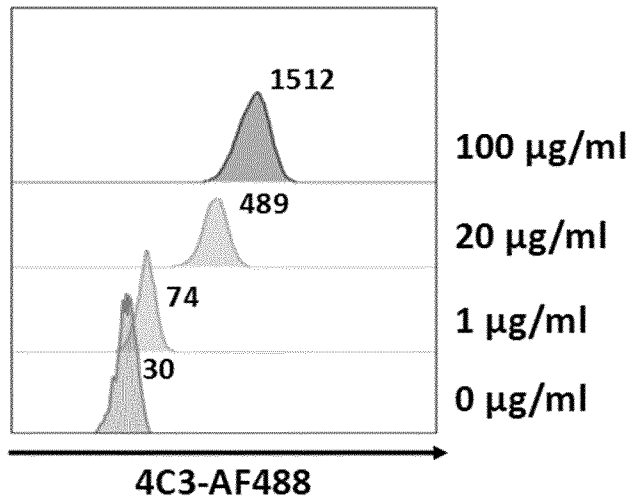
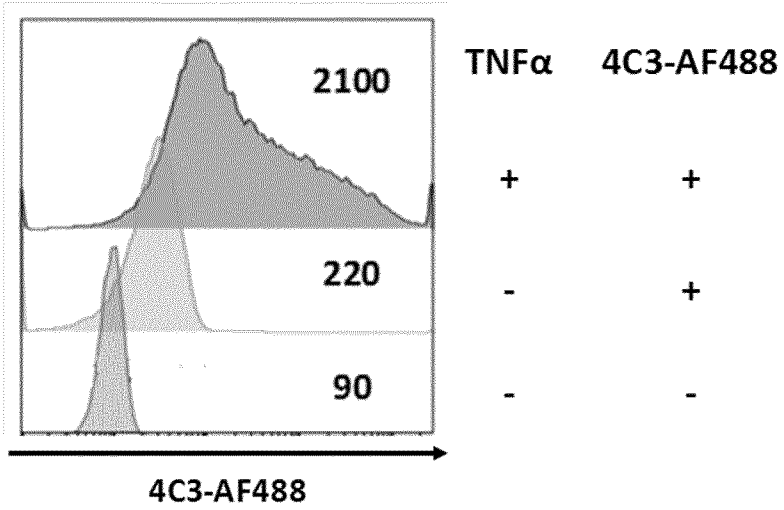


FIGURE 6 (1/2)

B



C



D

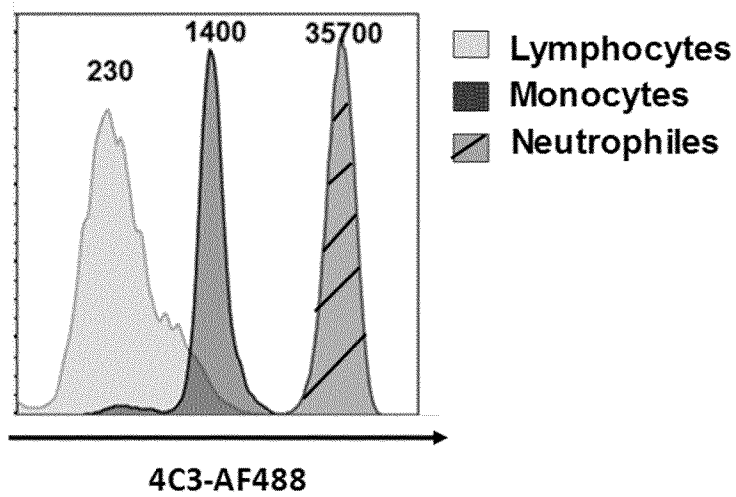


FIGURE 6 (2/2)

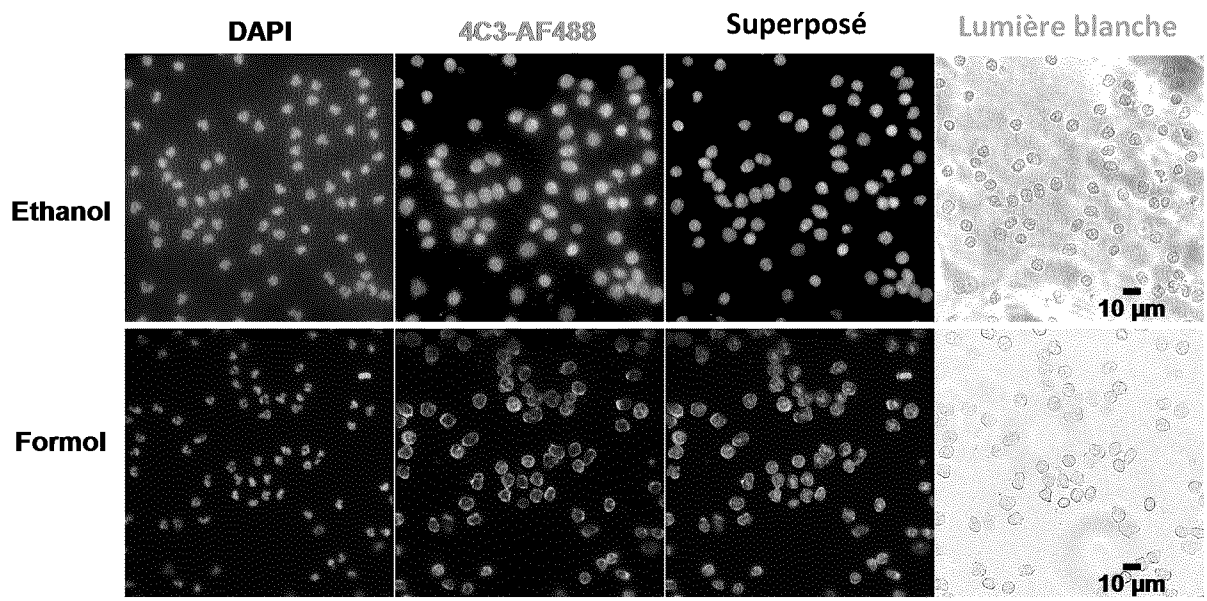


FIGURE 7

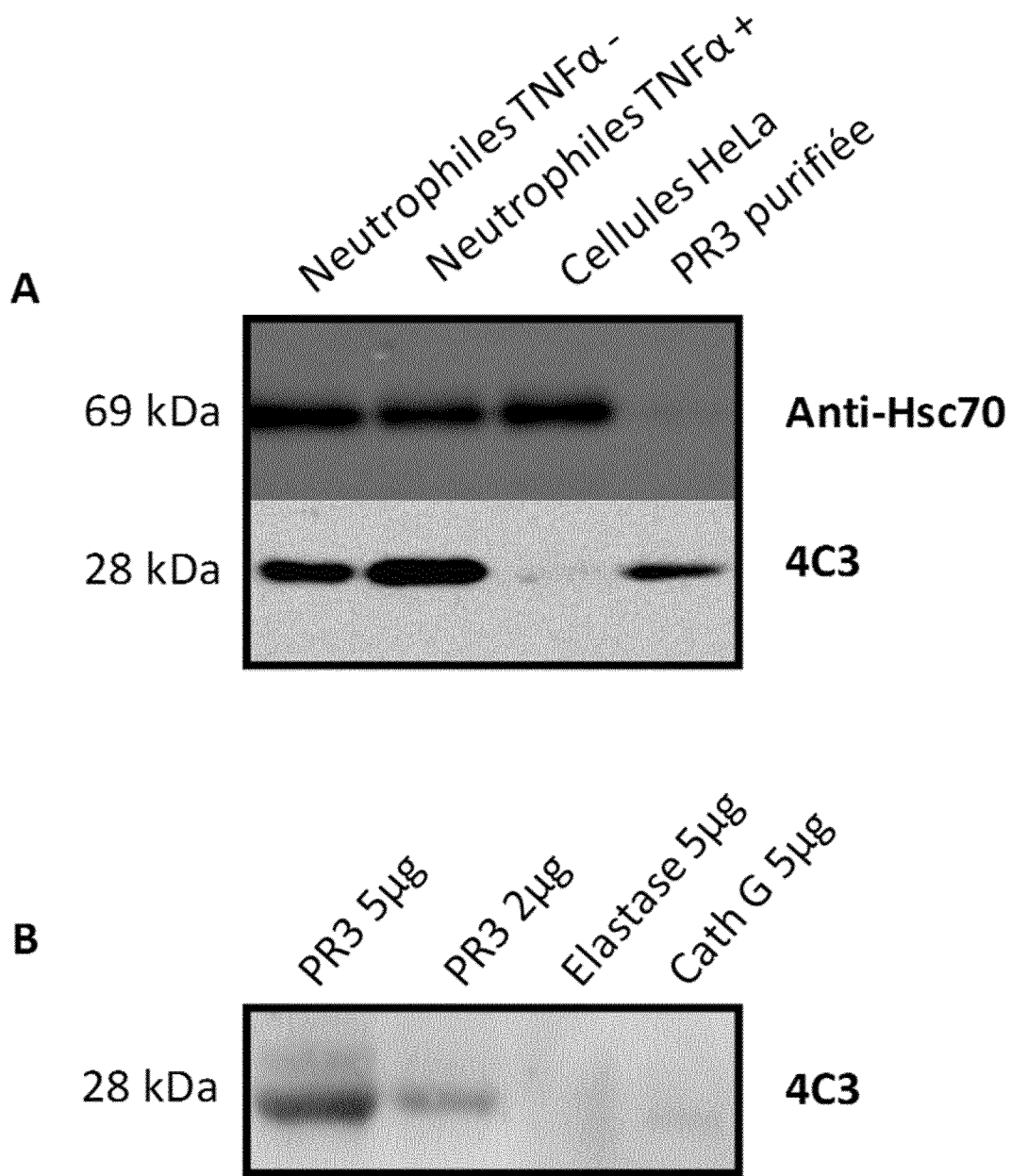


FIGURE 8

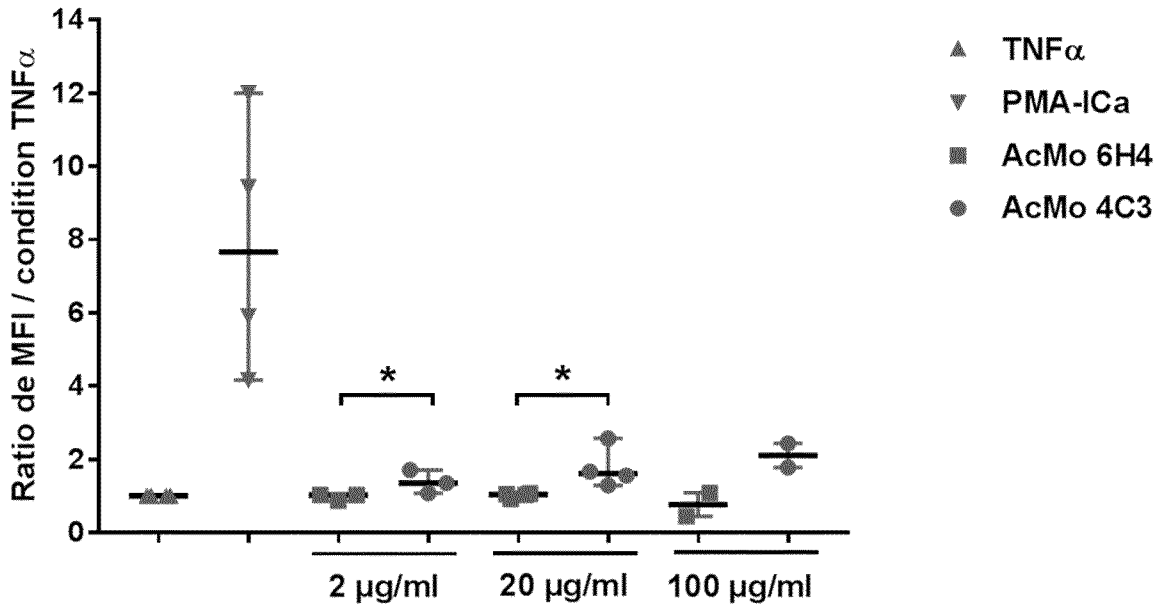


FIGURE 9

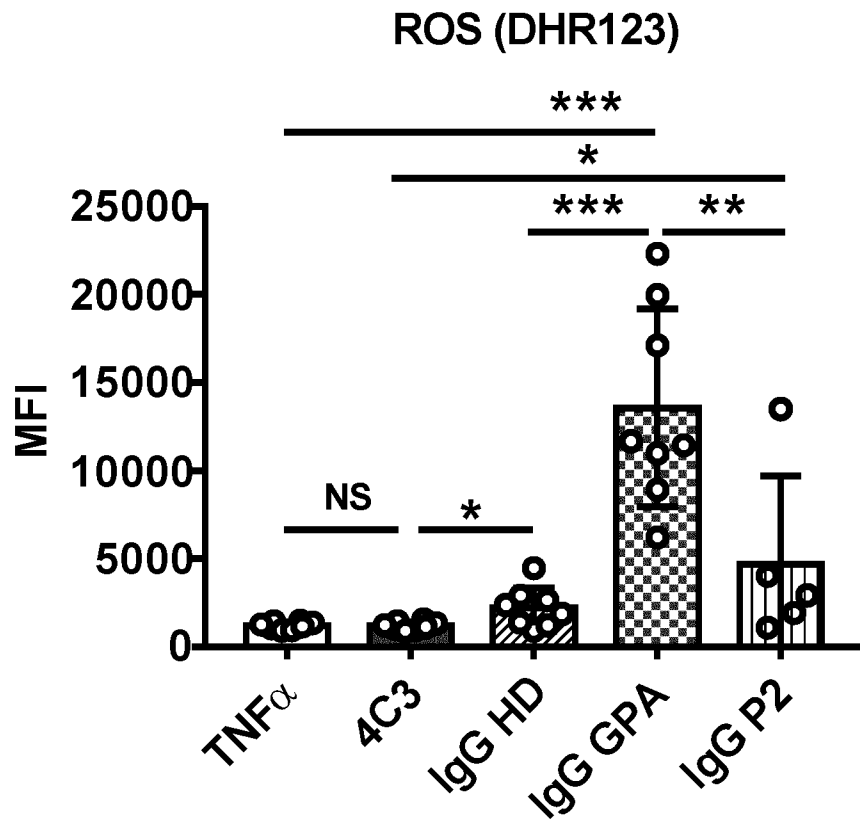


FIGURE 10

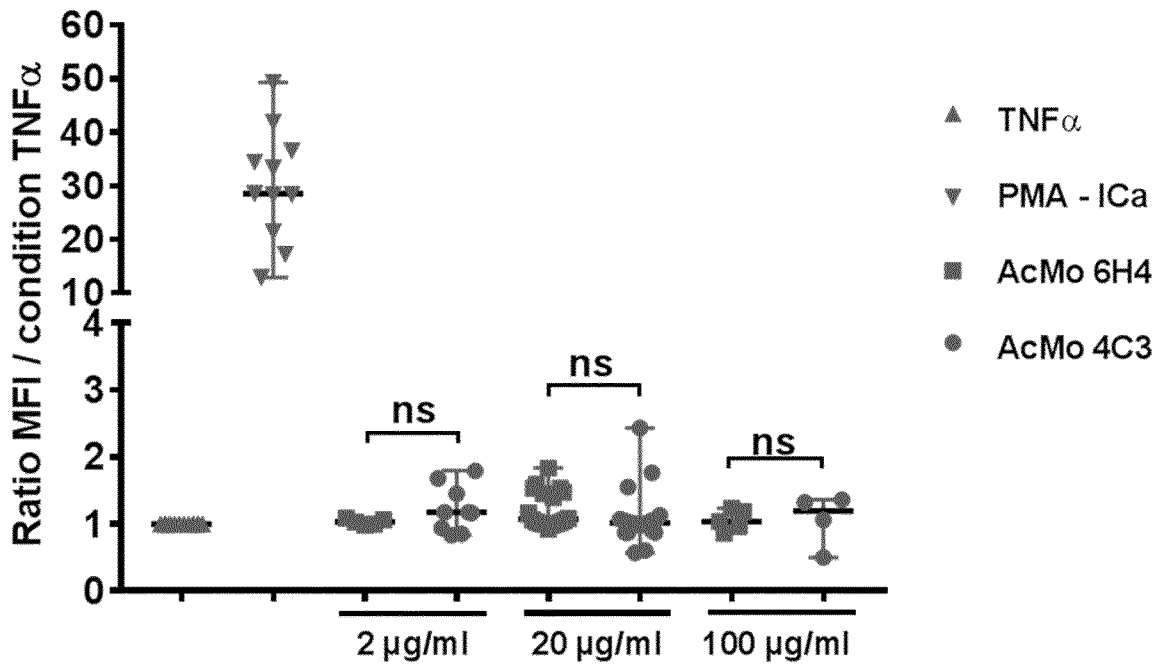


FIGURE 11

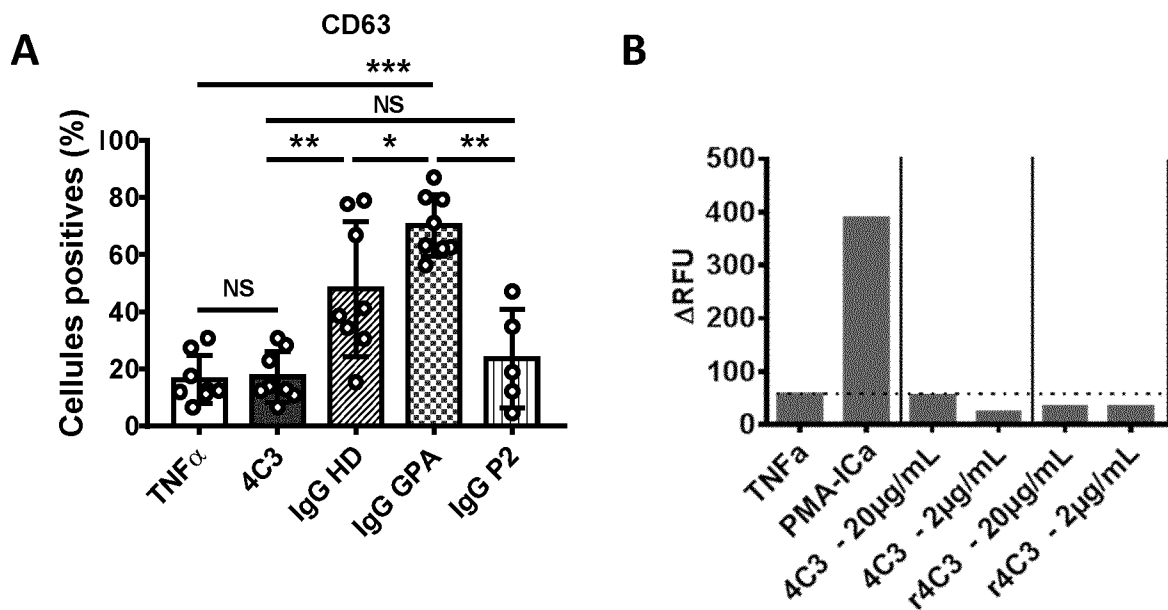


FIGURE 12

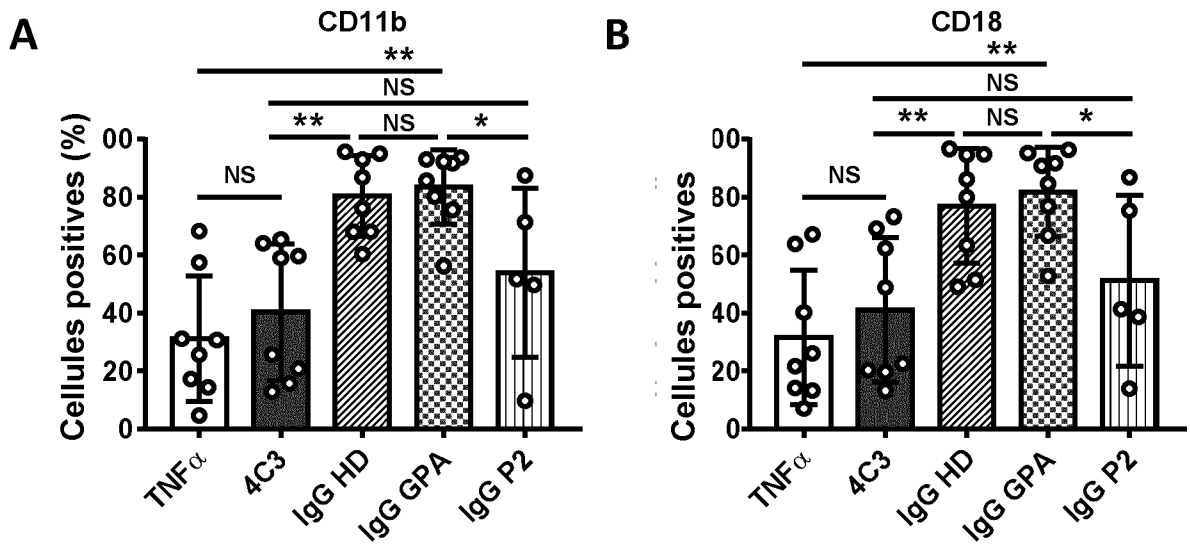


FIGURE 13

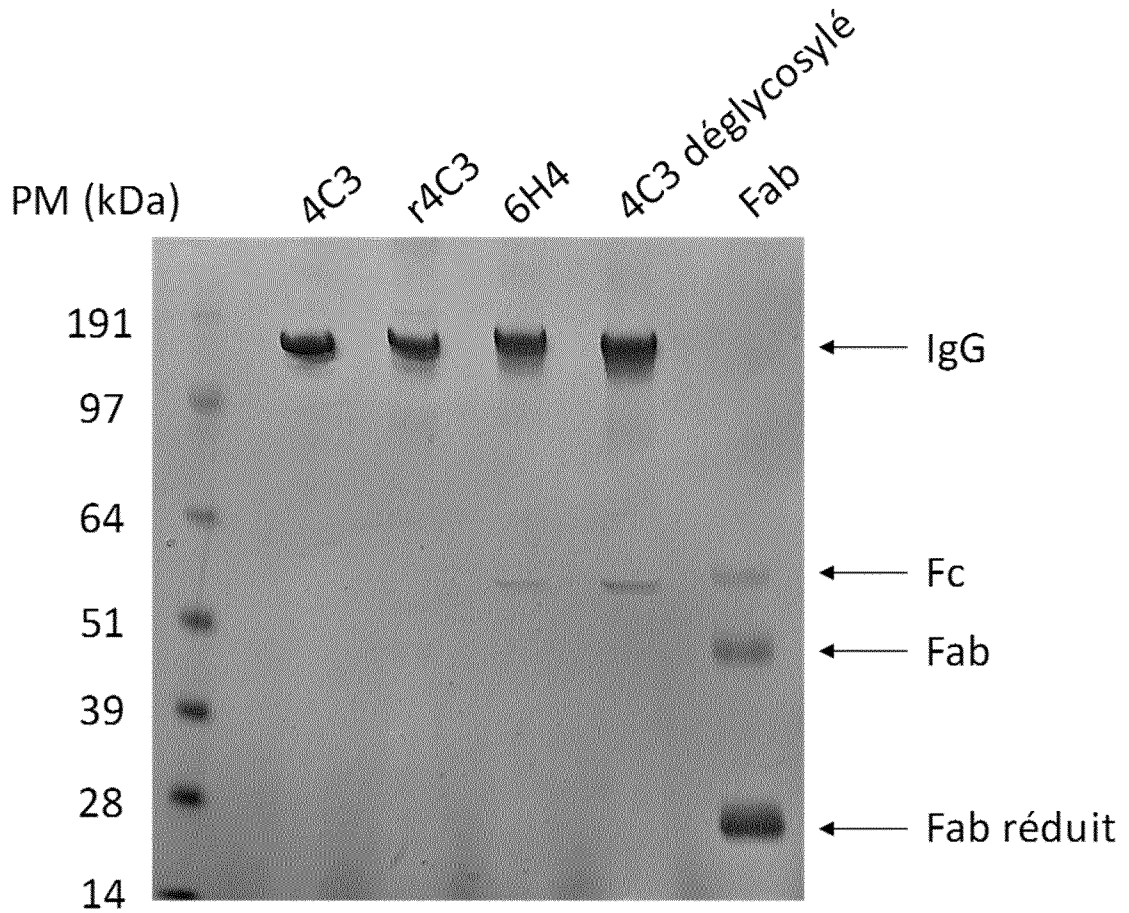


FIGURE 14

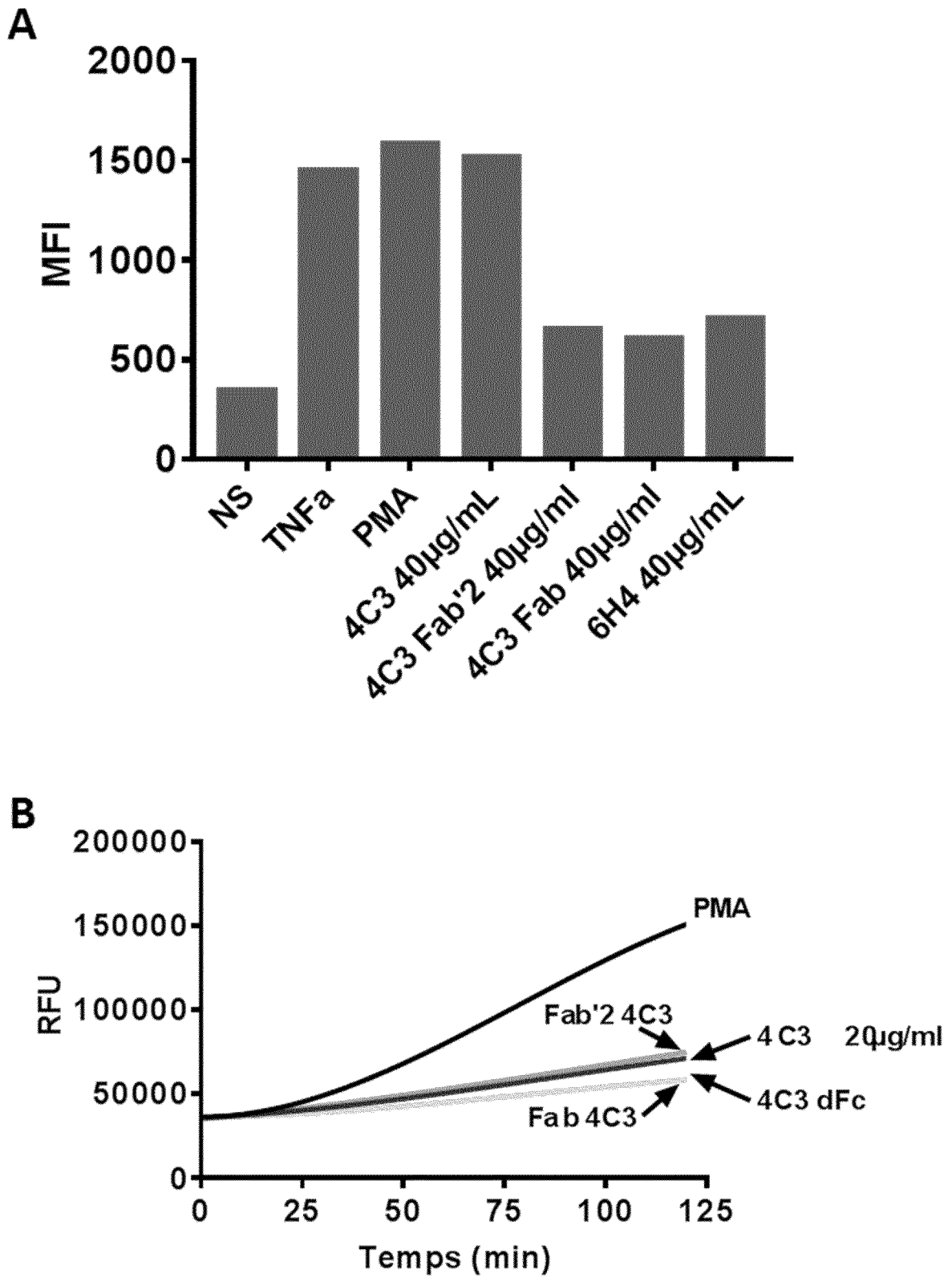


FIGURE 15

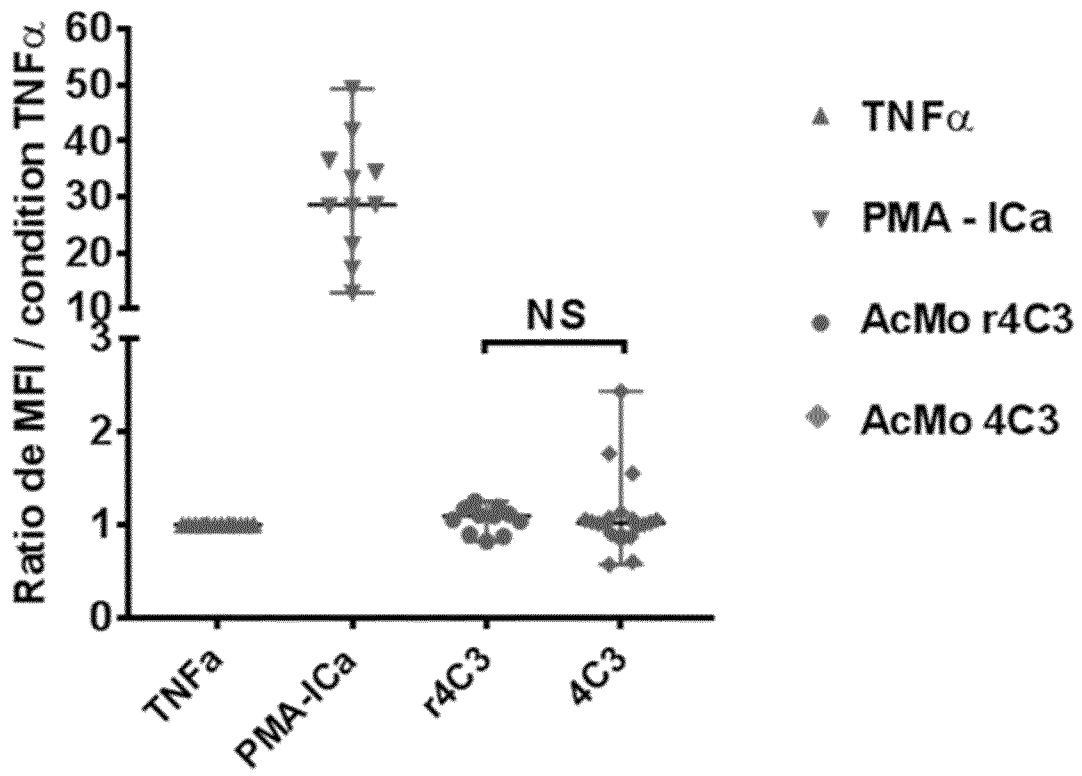


FIGURE 16

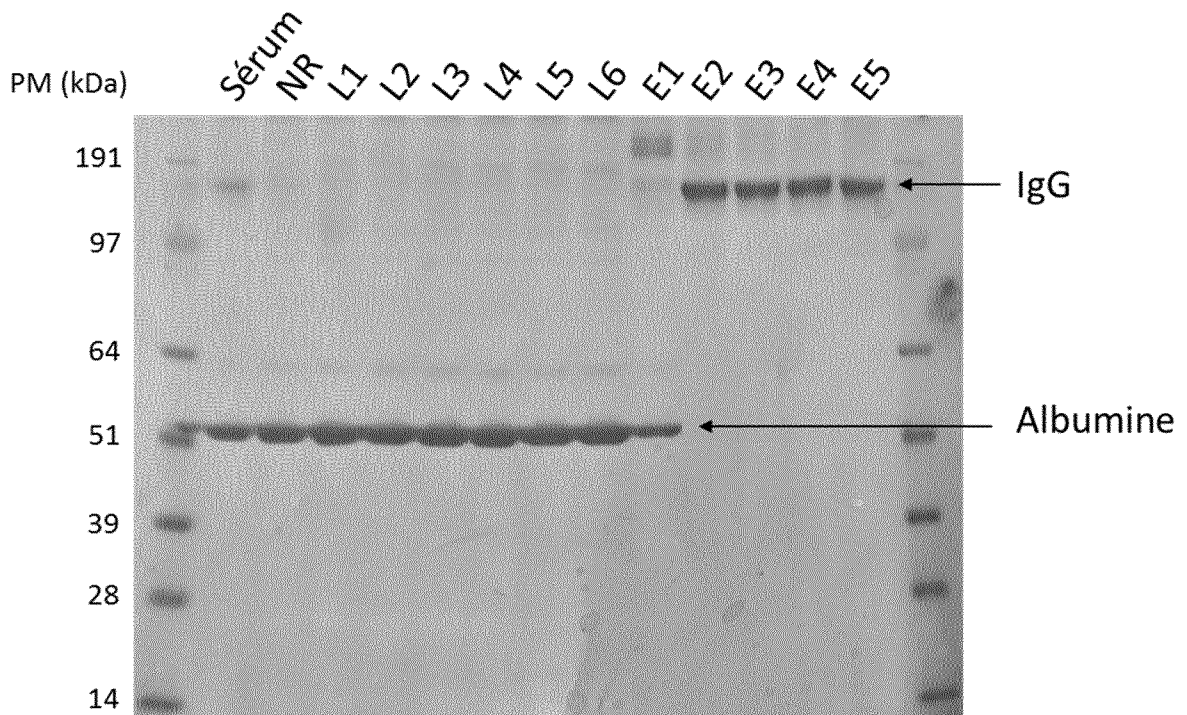


FIGURE 17

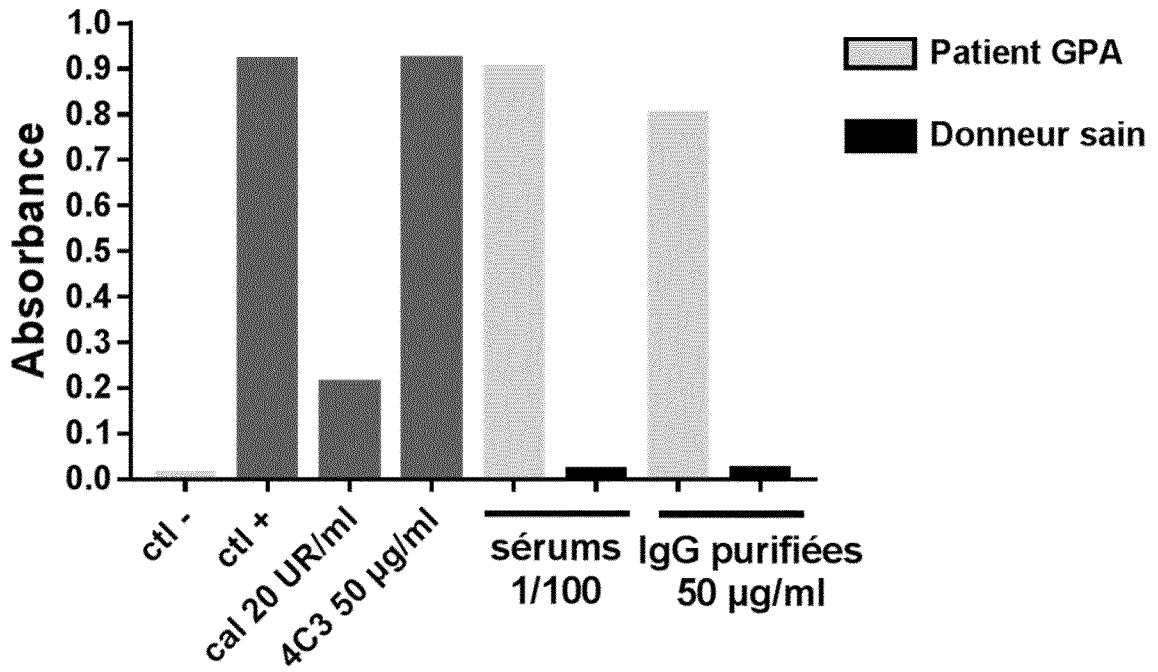


FIGURE 18

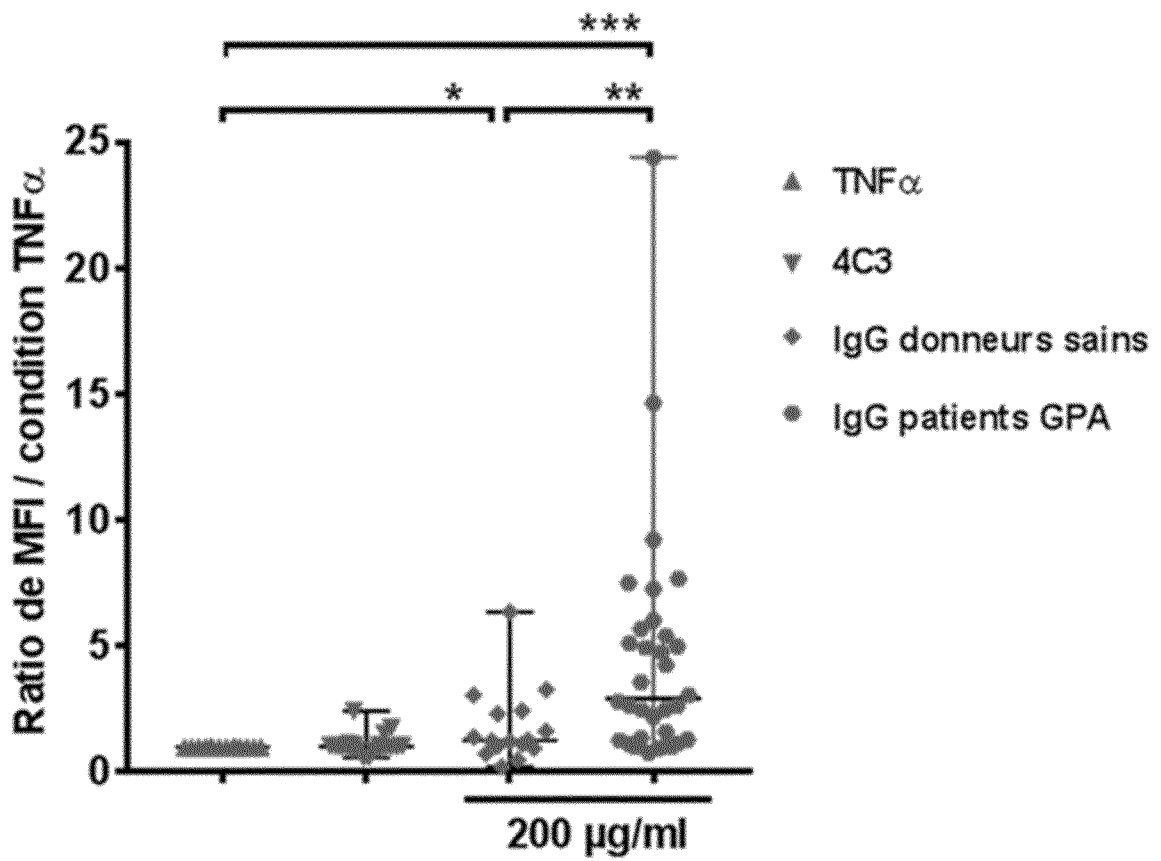


FIGURE 19

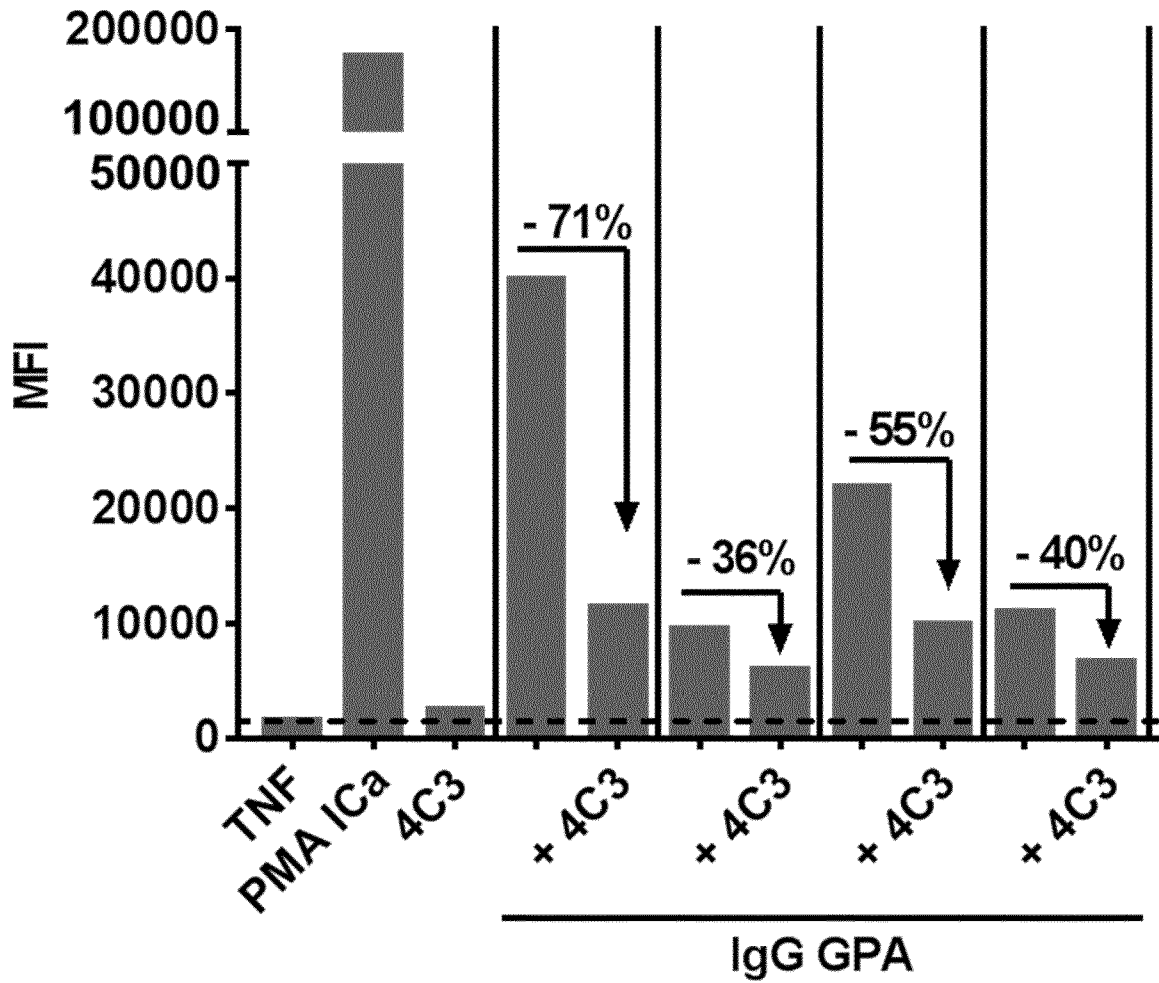


FIGURE 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2020/079208

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/40(2006.01)i; A61K 49/00(2006.01)i; A61P 9/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; A61K; A61P		
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 practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012108650 A2 (UNIV KONKUK IND COOP CORP [KR]; SHIN CHAN YOUNG [KR] ET AL.) 16 August 2012 (2012-08-16) figure 3; examples 1-1	1-13
A	WILHELM H. SCHMITT ET AL. "Treatment of refractory Wegener's granulomatosis with antithymocyte globulin (ATG): An open study in 15 patients" <i>KIDNEY INTERNATIONAL</i> , GB, Vol. 65, No. 4, 01 April 2004 (2004-04-01), pages 1440-1448 DOI: 10.1111/j.1523-1755.2004.00534.x ISSN: 0085-2538, XP055707492	1-4
A	R Tarzi ET AL. "Current and future prospects in the management of granulomatosis with TCRM" <i>Therapeutics and Clinical Risk Management</i> , 17 April 2014 (2014-04-17), pages 1-12, Retrieved from the Internet: https://www.dovepress.com/current-and-future-prospects-in-the-management-of-granulomatosis-with-peer-reviewed-fulltext-article-TCRM [retrieved on 2020-06-22] DOI: https://doi.org/10.2147/TCRM.S41598 XP055707496	1-4
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 19 February 2021		Date of mailing of the international search report 03 March 2021
Name and mailing address of the ISA/EP European Patent Office p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk Netherlands Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer Marinoni J-C Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2020/079208

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CAROL A LANGFORD. "Wegener's granulomatosis: current and upcoming therapies" <i>ARTHRITIS RESEARCH</i> , GB, Vol. 5, No. 4, 29 May 2003 (2003-05-29), pages 180-191 DOI: 10.1186/ar771 ISSN: 1465-9905, XP055707503	1-13
A	JEREMY M CLAIN ET AL. "Biologic response modifiers for granulomatosis with polyangiitis (Wegener's): from promise to reality" <i>INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL RHEUMATOLOGY</i> , UK, Vol. 8, No. 3, 01 June 2013 (2013-06-01), pages 383-397 DOI: 10.2217/ijr.13.23 ISSN: 1758-4272, XP055707519	1-4
A	SEDA SEREN ET AL. "Consequences of cathepsin C inactivation for membrane exposure of proteinase 3, the target antigen in autoimmune vasculitis" <i>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY</i> , US, Vol. 293, No. 32, 20 June 2018 (2018-06-20), pages 12415-12428 DOI: 10.1074/jbc.RA118.001922 ISSN: 0021-9258, XP055707523	1-13
A	ARNAUD MILLET ET AL. "Proteinase 3 on apoptotic cells disrupts immune silencing in autoimmune vasculitis" <i>JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION</i> , GB, Vol. 125, No. 11, 02 November 2015 (2015-11-02), pages 4107-4121 DOI: 10.1172/JCI78182 ISSN: 0021-9738, XP055707540	1-13
A	Françoise Dupuy Maury. "Maladies auto-immunes: dompter le système immunitaire" <i>Science & Santé</i> , 01 January 2017 (2017-01-01), pages 1-12, Retrieved from the Internet: https://www.institutcochin.fr/linstitut/actualites/quand-le-pcna-migre-les-cellules-cancereuses-fest-orient/SS34_WEB.pdf [retrieved on 2020-06-22] XP055707573	1-13

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/EP2020/079208

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2012108650	A2	16 August 2012	KR	20120091936	A	20 August 2012
				WO	2012108650	A2	16 August 2012
.....							

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2020/079208

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C07K16/40 A61K49/00 A61P9/00 ADD.				
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB				
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C07K A61K A61P				
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche				
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data				
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS				
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées		
X	WO 2012/108650 A2 (UNIV KONKUK IND COOP CORP [KR]; SHIN CHAN YOUNG [KR] ET AL.) 16 août 2012 (2012-08-16) figure 3; exemples 1-1 -----	1-13		
A	WILHELM H. SCHMITT ET AL: "Treatment of refractory Wegener's granulomatosis with antithymocyte globulin (ATG): An open study in 15 patients", KIDNEY INTERNATIONAL, vol. 65, no. 4, 1 avril 2004 (2004-04-01), pages 1440-1448, XP055707492, GB ISSN: 0085-2538, DOI: 10.1111/j.1523-1755.2004.00534.x ----- -/--	1-4		
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </td> </tr> </table>			<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> 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 "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 19 février 2021		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 03/03/2021		
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Marinoni J-C		

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	R Tarzi ET AL: "Current and future prospects in the management of granulomatosis with TCRM", Therapeutics and Clinical Risk Management, 17 avril 2014 (2014-04-17), pages 1-12, XP055707496, DOI: https://doi.org/10.2147/TCRM.S41598 Extrait de l'Internet: URL: https://www.dovepress.com/current-and-future-prospects-in-the-management-of-granulomatosis-with-peer-reviewed-fulltext-article-TCRM [extrait le 2020-06-22]	1-4
A	CAROL A LANGFORD: "Wegener's granulomatosis: current and upcoming therapies", ARTHRITIS RESEARCH, vol. 5, no. 4, 29 mai 2003 (2003-05-29), pages 180-191, XP055707503, GB ISSN: 1465-9905, DOI: 10.1186/ar771	1-13
A	JEREMY M CLAIN ET AL: "Biologic response modifiers for granulomatosis with polyangiitis (Wegener's): from promise to reality", INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL RHEUMATOLOGY, vol. 8, no. 3, 1 juin 2013 (2013-06-01), pages 383-397, XP055707519, UK ISSN: 1758-4272, DOI: 10.2217/ijr.13.23	1-4
A	SEDA SEREN ET AL: "Consequences of cathepsin C inactivation for membrane exposure of proteinase 3, the target antigen in autoimmune vasculitis", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 293, no. 32, 20 juin 2018 (2018-06-20), pages 12415-12428, XP055707523, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.RA118.001922	1-13
A	ARNAUD MILLET ET AL: "Proteinase 3 on apoptotic cells disrupts immune silencing in autoimmune vasculitis", JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 125, no. 11, 2 novembre 2015 (2015-11-02), pages 4107-4121, XP055707540, GB ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JCI78182	1-13
	----- -/--	

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>Françoise Dupuy Maury: "Maladies auto-immunes: dompter le système immunitaire", Science & Santé, 1 janvier 2017 (2017-01-01), pages 1-12, XP055707573, Extrait de l'Internet: URL:https://www.institutcochin.fr/linstitut/actualites/quand-le-pcna-migre-les-cellules-cancereuses-festoient/SS34_WEB.pdf [extrait le 2020-06-22]</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-13

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2020/079208

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2012108650 A2	16-08-2012	KR 20120091936 A WO 2012108650 A2	20-08-2012 16-08-2012
