

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 17.12.12.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 20.06.14 Bulletin 14/25.

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

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : LFB BIOTECHNOLOGIES — FR.

⑦② Inventeur(s) : DE ROMEUF CHRISTOPHE.

⑦③ Titulaire(s) : LFB BIOTECHNOLOGIES.

⑦④ Mandataire(s) : GROSSET FOURNIER ET DEMA-
CHY Société à responsabilité limitée.

⑤④ UTILISATION D'ANTICORPS MONOCLONAUX POUR LE TRAITEMENT DE L'INFLAMMATION ET
D'INFECTIONS BACTÉRIENNES.

⑤⑦ La présente invention concerne une composition com-
prenant des anticorps monoclonaux dirigés contre une cyto-
kine pro-inflammatoire circulante, lesdits anticorps ayant
une affinité forte pour le récepteur FcγRIIIa (CD 16), en par-
ticulier le taux de fucose de l'ensemble des anticorps de la-
dite composition étant inférieur à 60%, et de préférence
inférieur à 50%.

pour son utilisation dans le cadre de la prévention ou du
traitement des phases précoces de l'inflammation.

La présente invention concerne également une compo-
sition comprenant des d'anticorps monoclonaux dirigés
contre une toxine bactérienne circulante, présentant une af-
finité pour le récepteur FcγRIIIa (CD 16) améliorée par rap-
port à des anticorps dirigés contre ladite toxine bactérienne,
produits dans la lignée cellulaire CHO, pour son utilisation
dans le cadre de la prévention ou du traitement des phases
précoces d'une infection bactérienne liée à la libération de
ladite toxine.



UTILISATION D'ANTICORPS MONOCLONAUX POUR LE TRAITEMENT DE L'INFLAMMATION ET D'INFECTIONS BACTERIENNES

La présente invention concerne l'utilisation d'anticorps monoclonaux pour le traitement de
5 l'inflammation, quelle qu'en soit l'origine.

L'inflammation, réponse normale de défense suite à une agression telle qu'une infection, une brûlure, une allergie..., est une réponse immunitaire stéréotypée. L'inflammation se traduit par une réponse immédiate et transitoire mettant en jeu un ensemble de réactions cellulaires et moléculaires, locales et périphériques, déclenchées à partir du foyer de
10 l'agression, dans le but de circonscrire l'agression, puis de la résoudre. L'inflammation est donc un processus de prévention suivi d'une réparation, étapes nécessaires au retour de la fonction normale du tissu agressé.

Cette manifestation inflammatoire est la résultante de la libération de messagers moléculaires, appelés facteurs inflammatoires moléculaires, ou substances chimiques, appelés facteurs inflammatoires chimiques, qui vont à leur tour mobiliser des réponses
15 générales de l'organisme qui sont autant de signaux systémiques. On distingue des réponses inflammatoires septiques (bactéries, virus, parasites) et des réponses stériles issues d'un syndrome métabolique comme le diabète, les hypercholestérolémies... L'intensité de l'inflammation dépend de l'agent infectieux et de la localisation du foyer, et
20 donc de la nature du tissu. La réaction peut être latente puis être amplifiée par d'autres agents.

Le phénomène inflammatoire normal, ou inflammation aigue, se décompose en deux phases principales: l'initiation et la progression.

La phase d'initiation est induite par les cellules infectées par les virus ou les bactéries, par
25 la présence de corps étrangers ou l'accumulation de molécules toxiques (radicaux, lipides, cholestérol...). Les premières réactions libèrent des messages qui diffusent en induisant des signaux de mort cellulaire voire de nécrose. Les cibles cellulaires sont les cellules endothéliales qui adoptent un changement morphologique par chimiotactisme laissant infiltrer des cellules du plasma sanguin.

30 La phase de progression de l'inflammation périphérique se caractérise en effet par une activation des terminaisons nerveuses qui provoque une vasodilatation facilitant la diffusion des molécules dans l'espace extracellulaire.

Les cellules infiltrées sont les mastocytes dégranulés, les monocytes, les macrophages, les polynucléaires neutrophiles, les lymphocytes. Ces cellules s'agrègent en raison de la forte

production de facteurs chimioattractants. Les molécules chimiotactiques sont captées par des récepteurs qui induisent un changement des propriétés migratoires des cellules.

Les macrophages activés libèrent un large spectre de médiateurs constitués de glycoprotéines de faible taille dénommées cytokines comme l'interleukine-1 (IL-1) et le

- 5 TNF (*tumeur necrosis factor*) ou cachectine. Ces médiateurs, dont l'action est pléiotropique, orchestrent les mécanismes qui contribuent à la mise en place d'une réponse élargie de l'inflammation. L'IL-1 et le TNF α agissent sur les cellules stromales, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses et provoquent la libération d'une seconde vague de cytokines et de molécules attractives des monocytes en activant d'autres cellules
- 10 quiescentes.

L'inflammation aiguë est donc un processus d'urgence de l'organisme en cas d'altération, mais cette inflammation peut aussi se retourner contre l'organisme si elle est activée de manière chronique.

- 15 L'inflammation chronique correspond à un échec de l'inflammation aiguë. La persistance de l'inflammation va être responsable de séquelles anatomiques et fonctionnelles qui font la gravité des maladies inflammatoires chroniques.

En effet, la persistance de la sécrétion de cytokines pro inflammatoires telles que le TNF α ou certaines interleukines maintenant l'inflammation peut induire une dégradation

20 tissulaire et cellulaire.

Le mécanisme de la chronicité n'est pas toujours compris. Il peut s'agir de la persistance de la substance pathogène. Mais il est aussi possible que cette inflammation se perpétue en l'absence de tout agent pathogène.

Cette réaction inflammatoire accompagne de nombreuses grandes pathologies chroniques.

- 25 La chronicité de l'inflammation et sa localisation à plusieurs organes est à l'origine du concept des maladies systémiques, maladies au cours desquelles l'autoimmunité joue un rôle important dans l'entretien de l'inflammation : lupus érythémateux disséminé, polyarthrite rhumatoïde, maladie de Gougerot-Sjögren, maladie de Crohn, colite ulcéreuse, maladie de Basedow (hyperthyroïdie), thyroïdite chronique de Hashimoto (hypothyroïdie),
- 30 syndrome de Goodpasture, pemphigus, myasthénie, diabète par insulino-résistance, anémie hémolytique auto-immune, purpura thrombocytopénique auto-immun, sclérodermie, polymyosite et dermatomyosite, anémie de Biermer, glomérulonéphrite, maladie de Wegener, maladie de Horton, périartérite noueuse et le syndrome de Churg et Strauss,

maladie de Still, polychondrite atrophiante, maladie de Behçet, sclérose en plaques, spondylarthrite.

5 Aussi, il existe à ce jour un réel besoin de fournir un traitement permettant de limiter les effets de l'inflammation chronique.

Par conséquent, l'un des buts de l'invention est de fournir des moyens de prévenir et de soigner les organismes soumis à une inflammation.

10 Un autre but de l'invention est de fournir un moyen d'éliminer les cytokines pro inflammatoires.

La présente invention concerne une composition comprenant des anticorps monoclonaux dirigés contre une cytokine pro-inflammatoire circulante, lesdits anticorps ayant une forte affinité pour le récepteur FcγRIIIa (CD16), pour son utilisation dans le cadre de la
15 prévention ou du traitement des phases précoces de l'inflammation.

La forte affinité de la région Fc de l'anticorps de l'invention pour le récepteur FcγRIIIa (CD16) permet à l'anticorps de l'invention de ne pas être déplacé par des anticorps IgG polyclonaux, notamment IgG présents dans le sérum sanguin.

20 Par forte affinité, on désigne une affinité au moins égale à $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, telle que déterminée par l'analyse Scatchard ou la technologie BIAcore (Label-free surface plasmon resonance based technology)

Dans un mode de réalisation particulier, la composition de la présente invention comprend des anticorps monoclonaux dirigés contre une cytokine pro-inflammatoire circulant, ayant
25 une affinité au moins égale à $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, au moins égale à $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ou $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, telle que déterminée par l'analyse Scatchard ou la technologie BIAcore.

La présente invention concerne en particulier une composition comprenant des anticorps monoclonaux dirigés contre une cytokine pro-inflammatoire circulante, le taux de fucose
30 de l'ensemble des anticorps de ladite composition étant inférieur à 60%, et de préférence inférieur à 50%, pour son utilisation dans le cadre de la prévention ou du traitement des phases précoces de l'inflammation.

Il était connu de l'homme du métier que le taux de fucosylation réduit de la chaîne lourde des anticorps augmente leur affinité pour les récepteurs des parties constantes des anticorps (Récepteurs Fc), en particulier les récepteurs Fc γ de type III (Fc γ RIII) exprimés à la surface des cellules NK et des macrophages.

5

Alors que la littérature décrit l'impact de la forte interaction des anticorps avec le Fc γ RIII comme augmentant le pouvoir cytotoxique de l'anticorps contre une cellule cible et cela via l'action de cellules effectrices comme les cellules NK et les macrophages, la présente invention repose sur la constatation faite par les Inventeurs qu'une cytokine reconnue par un anticorps à forte affinité pour le CD16 sera « capturée » préférentiellement par lesdits anticorps et sera ensuite détruite par les macrophages, après phagocytose du complexe cytokine-anticorps.

10

Un tel mécanisme n'entre pas en compétition avec les cellules tueuses naturelles (NK), qui expriment également les Fc γ RIII à leur surface, et la lyse cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) n'est pas impliquée.

15

Les anticorps anti-cytokine selon l'invention servent de bio-épurateurs permettant l'élimination des cytokines.

Lesdits anticorps de la composition selon l'invention sont tels :

- qu'ils sont dirigés contre des épitopes différents de ladite cytokine pro-inflammatoire circulante, ou
- qu'ils sont tous dirigés contre le même épitope de ladite cytokine pro-inflammatoire circulante,
- qu'ils possèdent tous les mêmes régions CDR, ou
- qu'ils possèdent tous la même séquence d'acides aminés de la chaîne légère et de la chaîne lourde.

20

25

Dans l'invention, les anticorps contenus dans la composition sont soit de même nature, soit de nature différente.

Par « anticorps de même nature » on entend des anticorps possédant une séquence d'acides aminés identiques. En d'autres termes, les anticorps de même nature possèdent tous les mêmes séquences d'acides aminés de leurs chaînes lourdes et de leur chaîne légères. Cependant, les anticorps de même nature selon l'invention peuvent présenter des modifications post traductionnelles différentes : par exemple, les anticorps de même nature peuvent posséder des glycosylations différentes.

30

Par « anticorps de nature différente » on entend des anticorps possédant des séquences d'acides aminés différentes. Il peut s'agir soit d'anticorps présentant des différences pour toutes leurs séquences d'acides aminés, soit possédant des différences pour une partie de leurs séquences d'acides aminés, le reste des séquences étant identiques.

5 Ainsi, une composition d'anticorps selon l'invention, où les anticorps sont de nature différente comprend :

- une composition d'anticorps polyclonaux,
- une composition d'anticorps présentant les mêmes régions constantes, mais où les régions variables sont différentes,
- 10 - une composition d'anticorps présentant les mêmes régions constantes, et les mêmes régions charpentes (FR) des régions variables, mais où les régions hypervariables (CDR) sont différentes,
- une composition d'anticorps chimères, présentant une région quelconque commune, le reste des séquences étant différentes.

15

Les anticorps contenus dans la composition selon l'invention présentent une haute affinité pour les FcγRIII. En particulier, cette haute affinité peut être associée à une faible quantité de fucose sur les chaînes glycaniques portées par les anticorps. Cette quantité de fucose, ou taux de fucose, est défini comme la proportion moyenne de fucose portée par tous les anticorps, par rapport à la quantité maximale de fucose que peuvent porter les chaînes glycaniques.

20

Le taux de fucose peut être défini de deux manières :

- soit l'on considère que tous les anticorps de la composition sont fucosylés de la même manière, et l'on raisonnera en termes de fucosylation pour un anticorps, ledit anticorps étant représentatif de la composition,
- 25 - soit l'on considère que chaque anticorps est fucosylé de manière différente, et le taux de fucose sera la moyenne de la fucosylation individuelle de chaque anticorps composant la composition de l'invention.

30

Dans le premier cas susmentionné, si un anticorps comporte 1 site de N-glycosylation par chaîne lourde, et que chaque site de glycosylation est susceptible de fixer une chaîne glycanique portant un fucose, ledit anticorps aura donc la possibilité de comporter au

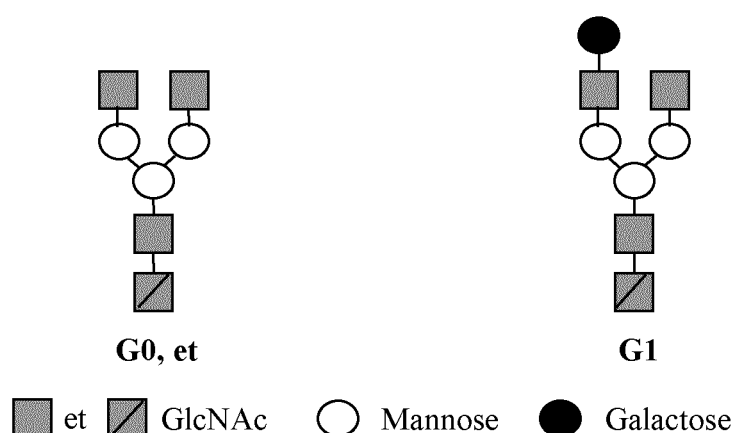
maximum 2 fucoses. Ainsi, la population d'anticorps comportant en moyenne 1 fucose aura alors un taux de fucose de 50% (soit $1 \times 100 / 2$).

Dans le second cas susmentionné, si la composition est composée de 10 anticorps, par exemple 3 anticorps ne sont pas fucosylés, 3 anticorps portent un fucose et 4 anticorps portent 2 fucoses (chaque anticorps pouvant contenir jusqu'à 2 fucoses), le taux de fucosylation de la composition sera de 55%, soit 11 fucoses sur 20 possibles.

La composition selon l'invention comprend donc des anticorps, de même nature ou de nature différente, pour la prévention ou le traitement des phases précoces de l'inflammation.

- 10 Par « phases précoces de l'inflammation », on entend dans l'invention les premières étapes de l'inflammation, c'est-à-dire l'initiation de l'inflammation, et notamment l'étape de libération des cytokines pro-inflammatoires comme le $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, $\text{IFN-}\alpha$, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IL-18, GM-CSF, en quantité supérieure à 1.5 fois, préférentiellement 3 fois voire supérieure à 5 fois la quantité normale.
- 15 Les anticorps de la composition selon l'invention peuvent de préférence être produits par des clones dérivés des lignées cellulaires telles que Vero (ATCC n° CCL 81), YB2/0 (ATCC n° CRL 1662) ou CHO Lec-1 (ATCC n° CRL 1735).

Dans un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne une composition telle que définie précédemment, où chacun des anticorps possède sur le site de glycosylation en position 297 de ses chaînes lourdes, l'une des formes glycaniques biantennées choisie parmi les structures suivantes :



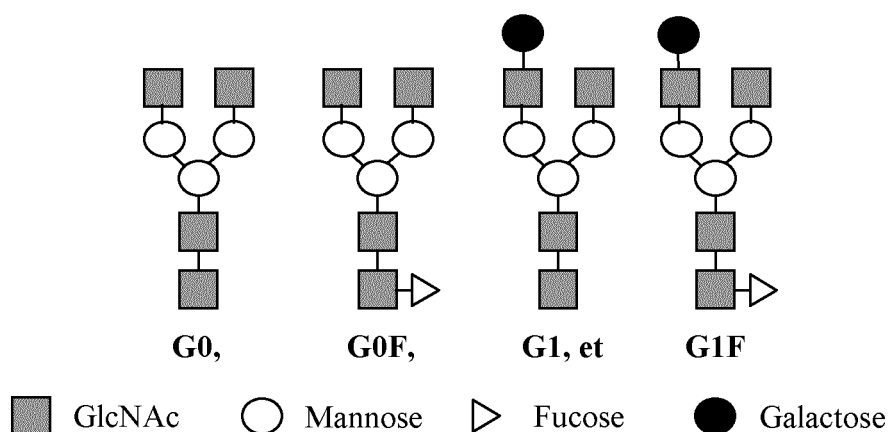
le GlcNAc représenté par dans les structures G'0 et G'1 ci-dessus étant susceptible d'être fucosylé.

Les anticorps de la composition selon l'invention portent sur l'acide aminé en position 297 de chacune des chaînes lourdes une structure glycanique particulière conférant une activité effectrice dépendante du FcγRIII.

De tels anticorps peuvent être obtenus à partir d'un procédé connu de l'homme du métier, tel que décrit dans WO 01/77181, et possèdent sur leur site de glycosylation (Asn 297) des structures glycaniques de type biantennées, avec des chaînes courtes et une faible sialylation. De préférence, leur structure glycanique présente des mannoses terminaux et/ou des N- acétyl-glucosamine (GlcNAc) terminaux non intercalaires.

Le GlcNAc représenté par  dans les structures G'0 et G'1 peut donc être soit non fucosylé, soit porter une molécule de fucose.

Dans un autre mode de réalisation avantageux, l'invention concerne une composition définie ci-dessus, où chacun des anticorps possède sur le site de glycosylation en position 297 de ses chaînes lourdes, l'une des formes glycaniques biantennées choisie parmi les structures suivantes :



Ainsi, les anticorps contenus dans la composition de l'invention sont caractérisés en ce qu'ils possèdent sur son site de glycosylation Asn 297 :

- des structures glycaniques de type biantennées, avec des chaînes courtes,
- une faible sialylation,
- des mannoses et/ou des GlcNAc terminaux non intercalaires.

De manière avantageuse, les anticorps compris dans la composition selon l'invention ont une teneur moyenne en acide sialique inférieure à 25%, 20%, 15%, ou 10%, de préférence 5%, 4% 3% ou 2%. Le taux de sialylation est défini de la même manière que le taux de fucose, comme précisé ci-dessus.

Dans encore un autre mode de réalisation avantageux, l'invention concerne une composition décrite précédemment, caractérisée en ce que les formes G0F + G1F des anticorps de ladite composition représentent moins de 50% des structures glycaniques portées par le site de glycosylation en position 297 de la chaîne lourde (Asn 297).

Ainsi, moins de la moitié des anticorps contenus dans la composition selon l'invention possèdent en position 297 une chaîne glycanique biantennée portant un fucose.

De manière encore plus avantageuse, le taux de fucose est d'environ 20% à environ 45%.

10

Un autre mode de réalisation avantageux de l'invention concerne une composition mentionnée précédemment, où les formes G0 + G1+ G0F + G1F des anticorps de ladite composition représentent plus de 60% desdites structures glycaniques et de préférence plus de 80% des structures glycaniques portées par le site de glycosylation en position 297 de la chaîne lourde.

15

Dans encore un autre mode de réalisation avantageux, l'invention concerne une composition telle que définie précédemment, où chaque anticorps monoclonal compris dans ladite composition possède une affinité pour les récepteurs FcγRIII au moins 1.5 fois supérieure à celle d'un anticorps naturel dirigé contre ladite cytokine pro-inflammatoire circulante.

20

Dans encore un autre mode de réalisation, l'invention concerne une composition telle que définie précédemment, où ladite cytokine pro-inflammatoire est choisie parmi les cytokines pro-inflammatoires suivantes :

25

- TNF- α ,
- IL-1 β ,
- IL-6,
- IL-8,
- IL-12,
- IL-17
- IL-18
- GM-CSF

30

Avantageusement, l'invention concerne une composition telle que définie précédemment, où chaque anticorps compris dans ladite composition ne possède pas de propriétés de neutralisation de ladite cytokine pro-inflammatoire circulante.

Les anticorps de la composition selon l'invention sont donc capables de reconnaître un ou
5 plusieurs épitopes de ladite cytokine pro-inflammatoire circulante. Cependant, bien que les anticorps reconnaissent spécifiquement la cytokine pro-inflammatoire, l'interaction anticorps-cytokine pro-inflammatoire ne bloque pas l'activité de la cytokine pro-inflammatoire. Ainsi, un complexe anticorps-cytokine pro-inflammatoire, s'il n'est pas éliminé par le système macrophage tel que défini dans l'invention, serait toujours présent
10 dans l'organisme.

Les anticorps de l'invention sont donc très efficaces non pas par leur propriétés neutralisantes, mais par leur capacité accrue à interagir avec les récepteurs FcγRIII, et ainsi éliminer de la circulation de l'organisme contaminé la cytokine pro-inflammatoire.

Dans encore un autre mode de réalisation avantageux, l'invention concerne une
15 composition définie précédemment, où ladite composition est utilisée à des doses variant de environ 0,05mg/m² à 2000mg/m², en particulier la dose unitaire administrée peut varier de 100μg à environ 1g par patient.

Encore plus avantageusement, l'invention concerne une composition telle que définie précédemment, ladite composition étant sous forme injectable, ou sous forme de spray.

20 La composition de l'invention peut être administrée notamment par voie intraveineuse, par voie sous-cutanée, par voie systémique, par voie locale au moyen d'infiltrations ou per os.

Le traitement peut être continu ou séquentiel, c'est-à-dire au moyen d'une perfusion délivrant ladite composition de manière continue et éventuellement constante, ou sous forme discontinue, par une ou plusieurs prises ou injections quotidiennes, éventuellement
25 renouvelées plusieurs jours, soit consécutifs, soit avec une latence sans traitement entre les prises.

Dans encore un autre mode de réalisation avantageux, l'invention concerne une composition telle que définie précédemment en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

30 L'invention concerne également une composition telle que définie précédemment, en association avec au moins un agent anti inflammatoire.

Parmi les agents anti inflammatoire de l'invention, on peut citer les corticoïdes (glucocorticoïdes ou anti-inflammatoires stéroïdiens) et les anti-inflammatoires non-stéroïdiens. Ces agents anti inflammatoires sont bien connus de l'homme de métier.

La présente invention concerne également l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre une toxine bactérienne circulante, pour son utilisation dans le cadre de la prévention ou du traitement des phases précoces d'une infection bactérienne liée à la libération de ladite toxine.

Par « infection bactérienne », on entend une infection provoquée par une souche bactérienne pathogène. Aux fins de l'invention, ladite souche bactérienne désigne toute souche de bactéries à gram positif ou toute souche de bactérie à gram négatif. La dichotomie gram positif/gram négatif est faite sur la base de la composition de la paroi des bactéries, celle des bactéries à gram positif étant très riche en peptidoglycane contrairement à celle des bactéries à gram négatif.

Les bactéries à gram positif sont par exemple celles appartenant au genre *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Listeria*,...

Les bactéries à gram négatif sont par exemple les bactéries de genre *Salmonelle*, *Escherichia Coli*, *Pseudomonas*,...

Seules les bactéries pathogènes entraînent une infection bactérienne. La pathogénicité est liée aux facteurs de virulence de la bactérie, à savoir des facteurs génétiques (chromosomiques ou extrachromosomiques), lesdits facteurs étant en effet responsables de l'implantation de la bactérie, sa multiplication ou ses effets néfastes (liés à la libération de toxines notamment).

L'infection bactérienne est divisée en plusieurs phases. La première consiste en la colonisation de l'hôte par la bactérie, (par exemple lors d'une blessure profonde au moyen d'un objet contaminé par *Clostridium tetani*, par blessure ou consommation de nourriture contaminée par *Clostridium botulinum*, par les voies respiratoires par *Corynebacterium diphtheriae* ...), ladite étape étant suivie de la phase exponentielle de croissance des bactéries, phase durant laquelle lesdites bactéries luttent contre le système immunitaire et utilisent les nutriments de l'hôte dont elles ont besoin pour se développer. Vient ensuite la libération des toxines puis la liaison de ces dernières sur leurs cibles, d'où une altération du fonctionnement normal de la cellule hôte (modification des échanges électrolytiques, inhibition de synthèses protéiques...), ou bien la lyse de la cellule hôte.

Les toxines sont des substances toxiques solubles produites par des bactéries, également par des champignons, des protozoaires ou des vers.

Les toxines bactériennes peuvent agir à des taux très faibles et agissent soit au niveau membranaire, soit sur des cibles intracellulaires, et sont parmi les substances biologiques les plus actives. Lesdites toxines peuvent être réparties en deux grandes catégories : les exotoxines et les endotoxines. Les exotoxines sont des protéines produites par des bactéries et sécrétées dans le milieu environnant tandis que les endotoxines sont des liposaccharides, à savoir des constituants de la membrane externe de la paroi des bactéries à gram négatif libérées à la suite de la lyse bactérienne.

10

Les infections bactériennes selon l'invention font référence à toutes les infections associées à la libération d'une quelconque exotoxine (telles que la toxine tétanique, la toxine botulique, la toxine diphtérique...) ou à la libération d'une quelconque endotoxine, dans la circulation sanguine.

15

La prophylaxie ou le traitement de telles infections au moyen d'anticorps dirigés contre lesdites toxines est bien connue de l'homme du métier.

Un premier moyen préventif est d'immuniser les individus avec des toxines inactivées et immunogènes (les anatoxines), afin de permettre la production par l'individu de lymphocytes B mémoires susceptibles d'être activés et d'intervenir rapidement en cas d'infection bactérienne susceptible de libérer la toxine.

20

L'homme du métier connaît les moyens pour traiter lesdites infections. Il existe des anticorps neutralisants dirigés contre les toxines, par exemple, tels que ceux décrits dans les documents FR 55671 et EP 0 562 132 pour traiter le tétanos, ou les documents US7700738 et US20100222555 pour traiter le botulisme. Pour exemple, le traitement actuel d'une infection bactérienne à *Clostridium tetani* repose sur l'administration d'un sérum anti-tétanique constitué d'immunoglobulines humaines anti-tétanos, visant à apporter au patient des anticorps dans l'attente qu'il en produise, de l'anatoxine tétanique visant à stimuler son système immunitaire afin qu'il produise ses propres anticorps, d'un antibiotique ainsi que de myorelaxants et de sédatifs.

30

Un anticorps est dit neutralisant lorsqu'il bloque l'effet de la toxine, et notamment sa fixation à sa cible et/ou son entrée dans la cellule cible.

Néanmoins, de tels anticorps ne permettent pas d'éliminer la toxine et lorsque celle-ci est liée à sa cellule cible, les anticorps deviennent inopérants.

A ce jour, il existe ainsi un réel besoin de fournir de nouveaux traitements permettant de

5 prévenir les dommages liés à la libération d'une toxine dans un organisme.

Par conséquent, l'un des buts de l'invention est de fournir des moyens de traiter les organismes infectés par une toxine ou de prévenir les effets délétères de ladite toxine.

Un autre but de l'invention est de fournir un moyen d'éliminer la toxine de l'organisme contaminé.

10 Un autre but de l'invention est de fournir une composition permettant d'éradiquer la toxine et la bactérie ou le microorganisme qui la produit.

L'invention concerne une composition d'anticorps monoclonaux dirigés contre une toxine bactérienne circulante, présentant une affinité pour le récepteur FcγRIIIa (CD16) améliorée

15 par rapport à des anticorps dirigés contre ladite toxine bactérienne, produits dans la lignée cellulaire CHO, pour son utilisation dans le cadre de la prévention ou du traitement des phases précoces d'une infection bactérienne liée à la libération de ladite toxine.

Les anticorps selon l'invention agissent ainsi pendant les phases précoces de l'infection.

20 Par « phases précoces d'une infection bactérienne », on entend les phases correspondantes à l'intervalle de temps s'étendant entre la libération de la toxine par la bactérie et la fixation au récepteur membranaire ou avant la pénétration de la toxine dans la cellule cible, lorsque la cible est intracellulaire. En d'autres termes, les étapes précoces de ces maladies correspondent au moment où la toxine est libre dans l'organisme et donc lorsqu'elle est

25 accessible aux anticorps.

Les anticorps sont sécrétés par les cellules du système immunitaire, les plasmocytes (aussi appelés les lymphocytes B sécréteurs) et constituent les immunoglobulines principales du sang. Par la suite, les termes « immunoglobuline » et « anticorps » sont équivalents.

30 Un anticorps se lie à l'antigène pour lequel il est spécifique. L'antigène peut être soluble ou membranaire et est constitué soit par un élément étranger à l'organisme (antigène bactérien, viral, ...) soit par un élément constitutif de l'organisme (auto-antigène). Selon un mode de réalisation de l'invention, l'antigène est une toxine bactérienne circulante.

La structure des immunoglobulines (Ig) est bien connue de l'homme du métier. Il s'agit de tétramères constitués de deux chaînes lourdes d'environ 50 kDa chacune (dites les chaînes H pour Heavy) et de deux chaînes légères d'environ 25 kDa chacune (dites les chaînes L pour Light), liées entre elles par des ponts disulfures intra et intercaténaux.

- 5 Chaque chaîne est constituée, en position N-terminale, d'une région ou domaine variable, dit VL pour la chaîne légère, VH pour la chaîne lourde, et en position C-terminale, d'une région constante, constitué d'un seul domaine dit CL pour la chaîne légère et de trois ou quatre domaines nommés CH1, CH2, CH3, CH4, pour la chaîne lourde.

Seules les IgM et les IgE possèdent le domaine CH4.

- 10 Les domaines constants sont codés par les gènes C et les domaines variables sont codés par les gènes V-J pour la chaîne légère et V-D-J pour la chaîne lourde.

L'assemblage des chaînes qui composent un anticorps permet de définir une structure tridimensionnelle caractéristique en Y, où :

- 15 - la base du Y correspond à la région constante Fc qui est reconnue par le complément et les récepteurs Fc (RFc) afin de médier les fonctions effectrices de la molécule, et
- les extrémités des bras du Y correspondent à l'assemblage respectif de la région variable d'une chaîne légère et de la région variable d'une chaîne lourde,
- 20 lesdites extrémités déterminant la spécificité de l'anticorps pour l'antigène.

- Plus précisément, il existe cinq isotypes de chaînes lourdes (gamma, alpha, mu, delta et epsilon) et deux isotypes de chaînes légères (kappa et lambda, les chaînes lambda étant elles mêmes divisées en deux types : lambda 1 et lambda 2). C'est la chaîne lourde qui
- 25 détermine la classe d'immunoglobuline. Il y a ainsi cinq classes d'Ig : IgG pour l'isotype gamma, IgA pour l'isotype Alpha, IgM pour l'isotype Mu, IgD pour l'isotype Delta et IgE pour l'isotype Epsilon.

- Les chaînes légères kappa et lambda sont partagées par toutes les classes et sous-classes. Chez l'homme, la proportion de kappa et lambda produite se situe dans un rapport de 2
- 30 pour 1.

De façon plus précise, au niveau des domaines VH et VL, la variabilité de séquences n'est pas distribuée de manière égale. En effet, les régions variables sont constituées de quatre régions très peu variables nommées charpentes ou *Framework* (FR1 à FR4) entre

lesquelles s'insèrent trois régions hypervariables ou *Complementary Determining Regions* (CDR1 à CDR3).

Pour de plus amples informations sur la structure et les propriétés des différentes classes d'immunoglobulines, l'homme du métier se référera à Daniel P. Stites *et al.*, « *Basic and Clinical Immunology* », 8ème édition, Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, page 71 et Chapitre 6.

Lesdits anticorps de la présente invention peuvent être murins, chimériques, humanisés ou humains.

10 Par « anticorps murin », on entend des anticorps contenant uniquement des séquences appartenant à toutes espèces de souris. Comme exemple d'un tel anticorps on peut citer l'anticorps anti-CD3 (Orthoclone OKT3®, muromonab-CD3) qui est le premier anticorps monoclonal murin admis pour l'usage thérapeutique chez l'homme.

15 Par « anticorps chimérique », on entend des anticorps dont les séquences des régions variables des chaînes légères et des chaînes lourdes appartiennent à une espèce différente de celle des séquences des régions constantes des chaînes légères et des chaînes lourdes.

Aux fins de l'invention, les séquences des régions variables des chaînes lourdes et légères sont préférentiellement d'espèce murine tandis que les séquences des régions constantes des chaînes lourdes et légères appartiennent à une espèce non-murine. A cet égard, pour les régions constantes, toutes les familles et espèces de mammifères non-murins sont susceptibles d'être utilisées, et en particulier l'homme, le singe, les muridés (sauf la souris), les suidés, les bovidés, les équidés, les félidés, les canidés ou encore les oiseaux, cette liste n'étant pas exhaustive.

20 De façon préférée, les anticorps chimériques selon l'invention contiendront des séquences des régions constantes des chaînes lourdes et légères d'anticorps humains et les séquences des régions variables des chaînes lourdes et légères d'anticorps murins. Pour exemples de tels anticorps chimériques souris/humain, on peut citer le rituximab (Mabthera®), un anti-CD20 et le cétuximab (Erbix®), un anti-EGFR.

30 Par « anticorps humanisé », on entend des anticorps dont tout ou partie des séquences des régions impliquées dans la reconnaissance de l'antigène (les régions hypervariables (*CDR : Complementarity Determining Region*) et parfois certains acides aminés des régions FR (régions *Framework*)) appartiennent à des séquences d'origine non-humaine tandis que les séquences des régions constantes et des régions variables non-

impliquées dans la reconnaissance de l'antigène sont d'origine humaine. Comme exemple d'un tel anticorps, on peut citer le daclizumab (Zenapax®), le premier anticorps humanisé à avoir été utilisé en clinique.

5 Par « anticorps humain », on entend des anticorps contenant uniquement des séquences humaines, aussi bien pour les régions variables et constantes des chaînes légères que pour les régions variables et constantes des chaînes lourdes.

Comme exemple d'un tel anticorps, on peut citer l'adalimumab (Humira®), un anti-TNF- α , le premier anticorps humain à avoir été autorisé pour une utilisation clinique.

10 Aux fins de l'invention, ces mêmes anticorps pourront être monoclonaux ou polyclonaux.

Les anticorps monoclonaux ou les « compositions d'anticorps monoclonaux » font référence à des anticorps possédant une spécificité unique vis-à-vis d'un antigène en se liant à un seul épitope. Ils s'opposent aux anticorps polyclonaux qui sont des mélanges d'immunoglobulines isolées du sérum et qui reconnaissent une série d'épitopes différents
15 sur l'antigène considéré.

Les anticorps chimériques selon l'invention peuvent être préparés en utilisant les techniques de recombinaison génétique. Par exemple, un anticorps chimérique peut être réalisé en construisant un gène chimère comprenant une séquence codant pour la région
20 variable de la chaîne lourde d'un anticorps monoclonal murin, liée grâce à un linker à une séquence codant pour la région constante de la chaîne lourde d'un anticorps humain, et en construisant un gène chimère comprenant une séquence codant pour la région variable de la chaîne légère d'un anticorps monoclonal murin, liée grâce à un linker à une séquence codant pour la région constante de la chaîne légère d'un anticorps humain. En transfectant
25 lesdits gènes chimères, par fusion de protoplastes ou toute autre technique, dans une lignée cellulaire, de myélome murin par exemple, on obtient la production d'anticorps chimériques souris-homme par les cellules transformées. C'est le document Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81, pp. 6851-55 (1984) qui a décrit pour la première fois la préparation de tels anticorps. Les documents Verhoeven *et al.*, *BioEssays*, 8:74, 1988,
30 Boulianne, G. L. *et al.*, *Nature*, 312:643 (1984), Sun, L.K., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 214-218, US 4,816,567, US 6,331,415, US 6,808,901 et EP 125023 pourront également être utilisés comme référence par l'homme du métier, de même que Bobrzecka, K., *et al.*, *Immunology Letters* 2, pp 151-155 qui décrit une procédure de fractionnement des ponts disulfures interchaînes des immunoglobulines suivie par un réarrangement

ordonné de ces mêmes ponts disulfures afin d'obtenir des anticorps formés de fragments Fab de lapin et de fragments Fc humain.

Une autre approche de préparation d'anticorps chimériques, telle que décrite dans le document FR 2 641 468, peut être de greffer des fragments Fab' d'un anticorps monoclonal murin sur des immunoglobulines polyclonales humaine, notamment IgG, ou sur des fragments Fc, ceci à l'aide d'un agent de couplage, par exemple un diimide. Des anticorps chimériques de type Ig-Fab' (également noté Fab'-Ig), Fc-Fab' ou (Fab')² peuvent ainsi être obtenus. De tels anticorps chimériques sont caractérisés par la greffe de l'ensemble du fragment Fab', et non seulement des parties variables.

Alternativement, d'autres auteurs ont décrit l'obtention d'anticorps chimériques monovalents par greffage de fragments Fab' d'anticorps polyclonaux sur des IgG ou sur des fragments Fc (G.T. Stevenson *et al.*, *Med. Oncol. & Tumor*, 1985, Pharmacother, vol. 1, n°4, 275-278, 1984).

La recombinaison homologue *in vivo* entre les portions des gènes codant pour les régions constantes des chaînes légères et des chaînes lourdes d'une immunoglobuline murine par des portions des gènes codant pour les régions constantes des chaînes légères et des chaînes lourdes d'une immunoglobuline humaine est également un moyen qui peut être utilisé afin d'obtenir de tels anticorps (US 5,204,244 ou US 5,202,238).

Cette liste n'est pas exhaustive.

Les anticorps humanisés selon l'invention peuvent également être préparés par des techniques bien connues, telles que celle décrites pour la première fois dans le document Jones *et al.*, *Nature*, 1986, 321-522-525. Il s'agit du remplacement des régions hypervariables (CDRs) d'un anticorps humain par des régions hypervariables d'origine murine, à la fois au niveau des chaînes légères mais aussi des chaînes lourdes. Cette technique, aujourd'hui bien connue de l'homme de l'art sous le nom de «*CDR grafting*» a été décrite dans de nombreux documents tels que Singer *et al.*, *J. Immun.* 150:2844-2857 (1993), Riechman *et al.*, *Nature* 323:326 (1988), Verhoeven *et al.*, *Science* 239:1534 (1988) ou encore les brevets US 5,225,539 ; US 5,585,089 ; EP 0682040 qui pourront également être utilisés comme référence.

La plupart des anticorps humanisés réalisés par greffage des régions CDRs présentent néanmoins une affinité réduite par rapport à un anticorps murin, ceci en raison du rôle majeur de certains acides aminés des régions charpentes, les régions adjacentes aux régions CDRs. C'est pourquoi aujourd'hui l'homme du métier remplace, bien souvent, non

seulement les CDRs, mais aussi les résidus des régions charpentes susceptibles de contribuer au site de liaison de l'antigène (Studicka *et al.*, 1994).

Une autre technique qui permet d'humaniser des anticorps est la technique de greffage des résidus déterminants spécifiques (*Specificity Determining Region, SDR*), qui consiste à greffer non plus l'ensemble des régions CDRs, mais uniquement les régions SDRs de l'anticorps non-humain dans les régions variables humaines (Tamura *et al.*, *J Immunol.* 2000 ; 164 : 1432-41). Les régions SDRs sont définies comme les régions des CDRs en contact direct avec l'antigène (Padlan *et al.* (1995), *FASEB J.* 9: 133-139). Cette technique nécessite donc l'identification des SDRs. Cela peut se faire, par exemple, par une détermination de la structure 3D du complexe antigène-anticorps, en utilisant la base de données des SDRs déjà identifiés (<http://paradox.harvard.edu/sdr>), ou bien grâce à des comparaisons des séquences variables humaines à celles de l'espèce non-humaine, ceci à l'aide de logiciels informatiques tels que CLUSTALW2, CLUSTALX, BLAST ou FASTA.

Une autre alternative pour obtenir des anticorps humanisés consiste à greffer des régions dites « CDRs abrégés » (*Grafting of abbreviated CDRs*). Il s'agit de la greffe des régions SDRs et de quelques résidus adjacents, en amont et en aval de la séquence. Les documents De Pascalis *et al.*, *The Journal of Immunology*, 2002, 169: 3076-3084 ; Kashmiri Syed V.S *et al.*, *Humanized Antibodies and their Applications*, Volume 36, Issue , May 2005, Pages 25-34 pourront être utilisés comme référence.

La technique du « *variable domaine resurfacing* », aussi nommée « *veneering* » telle que développée par ImmunoGen (US 5,639,641) peut également être utilisée. Cette technologie consiste à donner un « profil » humain à un domaine variable de souris en remplaçant les résidus exposés à la surface dans les régions charpentes des anticorps murins par les résidus habituellement trouvés à la surface des anticorps humains. Les documents Roguska *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; Mark G. E. *et al* (1994) in *Handbook of Experimental Pharmacology* vol. 113: *The pharmacology of monoclonal Antibodies*, Springer-Verlag, pp 105-134 pourront également servir de référence.

La plateforme Germliner™ développée par AvantGen peut également être utilisée (<http://www.avantgen.com/AvantGensTechnologiesandServices.pdf>). Cela permet d'obtenir des anticorps humanisés dans lesquels seuls des CDR3 sont d'origine non-humaine.

Cette liste n'est pas exhaustive.

L'obtention des anticorps selon l'invention est, de plus, préférentiellement couplée à un processus de maturation d'affinité.

Divers techniques de mutation, aléatoire ou dirigée, bien connues dans l'état de la technique, sont utilisées afin d'augmenter l'affinité desdits anticorps. Ces dernières miment
5 *in vitro* le processus de maturation d'affinité. Les anticorps ainsi produits sont ensuite sélectionnés, notamment sur *phage display*.

L'introduction de mutations par échange de chaînes (*chain shuffling*), telle que décrite dans les documents Clakson *et al.*, (1991) ; Marks *et al.*, (1992) ; S.G. Park *et al* (2000) est une des premières techniques qui peut être utilisée. Des domaines VL et VH de
10 forte affinité sont sélectionnés indépendamment dans différentes librairies de domaines, puis fusionnés. Une sélection permet ensuite d'isoler le clone de plus forte affinité, ladite affinité étant de l'ordre de celle d'un anticorps isolé lors d'une réponse secondaire *in vivo*. Lorsque ce n'est pas l'intégralité du domaine qui est muté, on parle de *DNA shuffling* (Cramer *et al.*, *Nature medicine*, 2(1):100-2 (1996).

15 Une technique alternative peut être la PCR à fort taux d'erreur (*error-prone PCR*), décrite par Hawkins *et al.*, 1992 ; Gram *et al.*, 1992. Cette PCR est caractérisée par l'emploi d'une polymérase qui induit beaucoup plus d'erreur qu'une enzyme classique ne le fait lors d'une amplification par PCR (en moyenne 1,7 base changée par domaine variable). De nombreuses mutations aléatoires sont ainsi insérées dans les séquences. La
20 banque obtenue est ensuite sélectionnée à l'aide de l'antigène afin de sélectionner les clones d'affinités accrues.

La dégénérescence par mutagenèse dirigée permet également d'augmenter l'affinité des anticorps. Il s'agit de mutations au niveau des acides aminés situés dans les boucles hypervariables. Cette technique peut être appliquée à tous les CDRs, les uns après les
25 autres, et les gains d'affinité peuvent être additifs (Barche *et al.*, 1994 ; Balint *et al.*, 1993). Une variante de cette technique dite le *CDR walking* consiste à ne muter les anticorps qu'au niveau de six CDRs maximum (Yang *et al.*, *J. Mol. Biol.* 254, 392–403 (1995). Le document FR 2 924 431 décrit l'obtention d'anticorps de haute affinité par ladite technique.

30 L'utilisation de souches mutagènes préalablement sélectionnées pour leur capacité à induire un taux élevé de mutations somatiques dans les domaines variables d'immunoglobulines est également un moyen d'obtenir des anticorps avec une forte affinité. Le document Holliger *et al.*, (1995) en est un exemple. Il décrit l'utilisation de la souche mutD5 qui induit des mutations ponctuelles, notamment le long du gène du scFv.

Les anticorps ainsi produits sont alors sélectionnés contre l'antigène, la stringence des sélections étant augmentée à chaque tour de sélection. Le document S.J. Cumbers, *et al.*, *Nature Biotechnology*, 20, 1129-1134 (2002) pourra également être pris comme référence.

La technique du *phage display* utilisant des vecteurs modifiés tels que décrits dans le document WO 2007/074496 ou la sélection sur *phage display* suivie de celle de *Biopanning* (Krebber *et al.*, (1997) ; WO 2006/117699) est également une autre alternative à l'obtention d'anticorps de haute affinité.

Lesdites technologies peuvent également, aux fins de l'invention, être utilisées avec des méthodes dérivées du *phage display* telles que le *ribosome display* (Irving, R.A *et al.*, (2001)) ou le *yeast display* (Chao, G *et al.*, *J. Mol. Biol.* 342(2):539-50, 2004).

Une autre alternative bien connue de l'homme du métier est encore d'utiliser la technique d'évolution moléculaire MutaGen™, développée par Millegen, et décrite dans le brevet US 7,670,809. Cette technologie permet de mimer l'hypermutation somatique, un phénomène naturel observé lors de la maturation des anticorps *in vivo*.

La technologie Massive Mutagenesis®, développée par Biomethodes (EP 1311670) est également une solution possible. Il s'agit d'une technique intermédiaire entre la mutagenèse dirigée et la mutagenèse aléatoire. La production d'anticorps de haute affinité obtenue par ladite technologie est décrite dans le document WO 2009/050388.

Ces différentes technologies ne sont pas exhaustives.

L'affinité desdits anticorps peut être déterminée par plusieurs méthodes, dont la résonance plasmonique de surface (RPS), à l'aide d'un appareil type BIAcore 2000 (*Pharmacia Biosensor*, Upsala, Suède). Les documents Malmquist M., *Current Opinion in Immunology*, 5:282-286 (1993) ; Jönsson U *et al.*, *Biotechniques*, 11:620-627 (1991) et Wu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:6037-6042 (1998) décrivent ce type de mesure.

Par « affinité », on entend la somme des forces de liaison et de répulsion entre un épitope et un paratope. Cela représente la capacité qu'a un anticorps à se lier à un antigène. L'affinité est souvent exprimée par la constante d'affinité (K_d ou constante de dissociation à l'équilibre).

La constante d'affinité est liée à la constante de dissociation (K_{off} ou k_d) et à la constante d'association (K_{on} ou k_a) par la relation $K_d = K_{off} / K_{on} = k_d / k_a$.

Par « constante de dissociation », on entend la constante de réaction associée à la dissociation d'un complexe antigène-anticorps.

Par « constante d'association », on entend la constante de réaction associée à l'association d'un complexe antigène-anticorps.

Les différents isotypes des immunoglobulines (IgM, IgA, IgE, IgD, IgG) diffèrent quant à leur activité biologique et leurs fonctions effectrices. Il existe également des différences d'activité entre les sous-classes des IgA (IgA1, IgA2) et des IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4).

Ces différences dépendent des récepteurs auxquels les régions Fc des immunoglobulines se lient et de la distribution de ces récepteurs sur la membrane des cellules effectrices.

Par « récepteur », on entend les récepteurs au fragment Fc (FcR). Lesdits récepteurs sont FcαR (IgA) ; FcγRI, FcγRII, FcγRIII (IgG) ; FcεRI, FcεRII (IgE) ; FcμR (IgM) ; FcδR (IgD) ; pIgR (récepteur poly-Ig) et FcRn (récepteur Fc néonatal).

Les récepteurs aux IgG sont également appelés CD64 (FcγRI), CD32 (FcγRII) et CD16 (FcγRIII). Huit gènes codant pour les FcγR ont été identifiés chez l'homme, mais seulement cinq codent pour des récepteurs exprimés (FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, FcγRIIIb). Tous sont des récepteurs activateurs des cellules effectrices, hormis le FcγRIIb qui lui est un récepteur inhibiteur de l'activation des cellules immunitaires (Muta T *et al.*, *Nature*, 1994, 368:70-73).

Plus précisément, lesdits récepteurs de type I sont caractérisés par une forte affinité pour les immunoglobulines (K_d de $5 \cdot 10^{-7}$ à 10^{-10} M) tandis que les types II et III sont caractéristiques des récepteurs de faible affinité (K_d inférieure à 10^{-7} M).

Pour plus d'informations sur les récepteurs Fc, voir Ravetch and Kinet, *Annual Review of Immunology*, vol 9:457-492 (1991).

Par « cellule effectrice », on entend toute cellule porteuse d'un récepteur Fc, telles que les lymphocytes, les monocytes, les neutrophiles, les cellules Natural Killer (NK), les éosinophiles, les basophiles, les mastocytes, les cellules dendritiques, les cellules de Langerhans et les plaquettes.

La région Fc est responsable des fonctions effectrices de l'anticorps, notamment des fonctions cytotoxiques.

C'est également cette région qui détermine la durée de demi-vie sérique de l'anticorps.

Par « fonction effectrice », on fait notamment référence à l'ADCC (*Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity*), la CDC (*Complement Dependant Cytotoxicity*) et l'ADCP (*Antibody Dependent Cellular Phagocytosis*). Lesdites fonctions ont pour finalité d'éliminer les cellules cibles de l'organisme.

10

L'ADCC est un mécanisme de défense de l'organisme médié par les cellules effectrices. Lesdites cellules reconnaissent les cellules cibles recouvertes d'anticorps spécifiques. La liaison R_{FC}-Fc active les cellules effectrices, qui vont alors détruire les cellules cibles par apoptose par exemple, à la suite de la libération par les granules cytoplasmiques de perforine et granzymes (Raghavan *et al.*, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:181-220, 1996 ; Ravetch *et al.*, *Annu Rev Immunol* 19:275-290, 2001).

15

De manière préférée, l'immunoglobuline sera de type IgG et le récepteur Fc sera le récepteur FcγRIIIa.

20

La CDC se réfère à la lyse des cellules cibles en présence de molécules du complément. Ce mécanisme fait référence à la voie classique du complément, la voie alterne et la voie des lectines étant indépendantes des anticorps.

Le système du complément est un ensemble de protéines sériques impliquées dans l'inflammation, l'activation de cellules phagocytaires et la lyse de membranes cellulaires.

Il est constitué de différents composants tels que C1, C4, C5, C9, cette liste n'étant pas exhaustive.

Une cascade de réaction enzymatique, impliquant une vingtaine de protéines, est déclenchée à la suite de la liaison de plusieurs C1q (un des composants de C1) à différents Fc d'anticorps liés à des antigènes présents sur la cellule cible. Les différentes réactions de protéolyse en chaîne qui en résultent, engendrent une lyse par choc osmotique de la cellule cible (CDC).

30

De manière préférée, l'immunoglobuline sera de type IgG particulièrement IgG1 et IgG3 qui sont considérés comme efficaces alors que les IgG2 et IgG4 sont considérés comme

peu actives voire inactives dans l'activation de la voie classique du complément (*Shakib F, Basic and Clinical Aspects of IgG Subclasses*, Karger, 1986).

L'ADCP est le mécanisme par lequel les anticorps (par leur fragment Fc) vont agir en tant qu'opsonines pour favoriser l'ingestion de la cellule cible par des phagocytes (cellules effectrices capable de phagocytose, neutrophiles et macrophages principalement). Les phagocytes liés à une cellule cible opsonisée l'ingèrent en l'entourant de pseudopodes. Ceux-ci fusionnent, et l'agent étranger est alors internalisé (endocyté) dans le phagocyte, désormais nommé le phagosome. Des granules et des lysosomes fusionnent avec le phagosome et versent, dans ce qui est devenu un phagolysosome, des enzymes qui digèrent ainsi la cellule cible. Les résidus seront ensuite libérés dans le milieu extracellulaire par exocytose (Munn DH *et al*, *Cancer Research* ; 51:1117–1123, 1991).

Les anticorps selon l'invention portent une chaîne oligosaccharidique au niveau de chaque asparagine 297 (Asn297, numérotation Kabat) de chacune des chaînes lourdes.

Il est bien connu de l'Homme du Métier que des anticorps possédant des chaînes oligosaccharidiques contenant peu ou pas de fucose, présentent une meilleure affinité pour le CD16 (FcγRIIIa) présent sur les cellules effectrices du système immunitaire.

Ainsi, une composition d'anticorps ayant une teneur en fucose inférieure à 65% au niveau des chaînes oligosaccharidiques portées par Asn297 est particulièrement préférée. La teneur en fucose peut être mesurée par des méthodes bien connues, par exemple par la méthode MALDI-TOF, HPCE-LIF, HPLC.

Avantageusement, l'invention concerne une composition telle que définie ci-dessus dans laquelle le taux de fucose des anticorps, ou la teneur en fucose des anticorps, est inférieure à 60%, ou inférieur à 50%, ou inférieure 40%, ou au moins 30%, ou même égale à 0%. Etant entendu qu'une teneur en fucose égale à 0% correspond à 100% des chaînes oligosaccharidiques portées par Asn297 qui sont sans fucose. Alternativement, la teneur en fucose peut être comprise entre 0% et 50% ou entre 10% et 50% ou entre 20 et 50%.

Dans un mode de réalisation particulier, les anticorps selon l'invention peuvent comprendre en outre des chaînes oligosaccharidiques qui présentent une bissection.

On entend par « bissection », au sens de la présente invention, tout résidu *N*-acétylglucosamine intercalaire greffé en β1,4 (GlcNAc intercalaire), notamment par action de la β1,4-*N*-Acétylglucosaminyltransferase III (GnTIII).

Dans un mode de réalisation particulier, une composition d'anticorps selon l'invention présente une teneur en bissection d'au moins 20%, par exemple au moins 30%, ou au moins 40%, ou encore au moins 50%, 60%, 70%.

Des méthodes pour produire des anticorps de l'invention comprenant au moins un domaine Fc d'une immunoglobuline et ayant des résidus N-acétylglycosamine intercalaires (GlcNac intercalaire) sont par exemple décrites dans les documents EP 1 071 700 et US 6 602 684 ou EP 1 692 182 et US 2005/123546, cette liste n'étant pas limitative. Par exemple, les anticorps selon l'invention peuvent être produits dans une cellule hôte exprimant au moins un acide nucléique codant pour un polypeptide ayant une activité de β -(1,4)-N-acétylglucosaminyltransférase III en une quantité suffisante pour modifier la glycosylation portée par le(s) domaine(s) Fc dudit anticorps.

Dans un autre mode de réalisation, les anticorps selon l'invention présentent une faible fucosylation, c'est-à-dire des structures glycaniques ayant une teneur en fucose inférieure à 65%. Dans un mode de réalisation particulier, les anticorps selon l'invention présentent des structures glycaniques ayant une teneur inférieure à 50% pour les formes G0F+G1F. Dans un mode de réalisation particulier, les anticorps comprennent une teneur supérieure à 60% pour les formes G0+G1+G0F+G1F, les formes G0F +G1F étant inférieures à 50%. Dans un autre mode de réalisation particulier, les anticorps comprennent une teneur supérieure à 60% pour les formes G0+G1+G0F+G1F, la teneur en fucose étant inférieures à 65%. Ces formes sont sélectionnées parmi les formes G0, G0F, G1 et G1F telles que décrites dans la présente demande.

Dans cet autre mode de réalisation, les anticorps comprennent en outre, sur les sites de glycosylation Asn297, une structure glycanique présentant des mannoses terminaux et/ou des N-acétylglucosamines terminaux non intercalaires.

Dans un mode de réalisation particulier, les anticorps comprennent, sur le site de glycosylation Asn297, une structure glycanique de type biantennée, avec des chaînes courtes, une faible sialylation, et une teneur supérieure à 60% pour les formes G0+G1+G0F+G1F, les formes G0F +G1F étant inférieures à 50%.

En particulier, les anticorps possèdent une teneur en acide sialique inférieure à 25%, 20%, 15%, ou 10%, de préférence 5%, 4% 3% ou 2%.

Dans un mode de réalisation particulier, les anticorps selon l'invention présentent des structures glycaniques telles que décrites dans WO 01/77181. Les anticorps peuvent notamment être sélectionnés en sélectionnant une lignée cellulaire capable de produire des anticorps présentant une forte affinité pour le récepteur CD16. Par exemple, les anticorps

peuvent être produits dans un hybridome, notamment un hétérohybridome obtenu avec le partenaire de fusion K6H6-B5 (ATCC CRL 1823) ou dans une cellule animale ou humaine produisant ledit anticorps, notamment une cellule dérivée des lignées Vero (ATCC CCL-81), une lignée cellulaire d'hybridome de rat, comme par exemple la lignée d'hybridome de rat YB2/0 (ATCC CRL-1662, cellule YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20, déposée à l'American Type Culture Collection) ou encore la lignée CHO Lec-1 (ATCC CRL-1735), CHO-Lec10, CHO dhfr- (par exemple CHO DX BII, CHO DG44), CHO Lec13, SP2/0, NSO, 293, BHK, COS, IR983F, un myélome humain comme Namalwa ou toute autre cellule d'origine humaine comme PERC6, CHO Pro-5, CHO dhfr- (CHO DX BII, CHO DG44), Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7, 293- HEK, BHK, K6H6, NSO, SP2/0-Ag 14 et P3X63Ag8.653.

Avantageusement, les anticorps peuvent être produits dans une lignée cellulaire choisie parmi YB2/0, Vero, CHO-lec10, CHO-lec13, CHO-lec1, CHOK1SV, CHO Knock Out pour la fucosyltransférase FUT8, CHO exprimant la GnTIII.

De manière particulièrement avantageuse, les anticorps de l'invention sont produits dans une lignée cellulaire d'hybridome de rat. Dans un mode de réalisation préféré, les anticorps sont produits dans l'hybridome de rat YB2/0 (cellule YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20, déposée à l'American Type Culture Collection sous le numéro ATCC CRL-1662) sélectionnée pour sa capacité à produire des anticorps présentant une forte affinité pour le CD16.

D'autres méthodes sont connues de l'homme du métier pour produire des anticorps à glycosylation optimisée. Par exemple l'utilisation d'inhibiteur de la glycosylation comme la kifunensine (inhibiteur de l'alpha mannosidase II), qui peut être ajoutée au milieu de culture des cellules productrices d'anticorps selon l'invention, selon la méthode décrite dans US 7 700 321. Des analogues de fucose peuvent également être introduits dans le milieu de culture de cellules productrices d'anticorps comme décrit dans le document US 20090317869.

Un autre moyen de produire des anticorps à glycosylation optimisée, est l'utilisation de cellules pour lesquelles la voie de production des GDP-fucose est inhibée, par le biais de l'inhibition de l'une au moins des enzymes du cycle de production du fucose, telle que décrit par exemple dans le document US 2010291628 ou US 20090228994, le document EP 1 500 698, le document EP 1 792 987 ou encore le document US 7 846 725, cette liste n'étant pas limitative. Il est également possible d'utiliser des ARN interférence (ARNi)

inhibant la 1,6-fucosyltransférase comme décrit dans le document US 7 393 683 ou le document WO 2006133148.

D'autres méthodes de préparation d'anticorps à glycosylation optimisée dans des animaux transgéniques sont décrites dans WO 200748077. Les anticorps peuvent également être produits dans des levures, comme cela est montré dans le document WO 0200879.

Pour produire des anticorps avec 100% d'oligosaccharides non fucosylés, c'est-à-dire totalement dépourvus de fucose au niveau de la glycosylation portée par l'Asn297, il est possible de mettre en œuvre les méthodes de préparation décrites dans les documents EP 1 176 195, US 7 214 775, US 6 994 292, US 7 425 446, US2010223686, WO2007099988, EP 1 705 251, cette liste n'étant pas limitative. Dans un mode de réalisation particulier, les anticorps sont produits dans des cellules modifiées par délétion du gène codant pour l' α 1,6- fucosyltransférase ou par addition d'une mutation de ce gène pour éliminer l'activité α 1,6- fucosyltransférase.

La présente invention repose sur la constatation faite par les Inventeurs qu'il est possible à l'aide d'anticorps possédant une forte affinité pour les récepteurs Fc γ RIII d'induire la clairance (l'élimination) rapide des toxines circulantes, dès leur libération par la bactérie.

Ainsi, une toxine reconnue par les anticorps selon l'invention sera « capturée » par lesdits anticorps et sera détruite par les macrophages, via la phagocytose du complexe immunitaire formé de la toxine et de l'anticorps dirigé contre elle.

Un tel mécanisme n'entre pas en compétition avec les cellules tueuses naturelles (NK), qui expriment également les Fc γ RIII à leur surface, et la lyse cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) n'est pas impliquée.

Les anticorps anti-toxine selon l'invention servent ainsi de « bio-épurateurs » permettant l'élimination des toxines. Par « bio-épurateurs », on entend le fait que lesdits anticorps peuvent soustraire du sang les toxines en circulation.

Dans un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne une composition telle que définie précédemment, dans laquelle lesdits anticorps monoclonaux possèdent une affinité pour les récepteurs Fc γ RIIIa au moins deux fois supérieure à celle d'un anticorps produit naturellement en réponse à la présence de la toxine bactérienne dans un organisme et dirigé

contre ladite toxine bactérienne, ou à celle d'anticorps produit dans la lignée cellulaire CHO.

Dans encore un autre mode de réalisation, l'invention concerne une composition telle que définie précédemment, où ladite toxine bactérienne est choisie parmi les toxines suivantes :

- la toxine tétanique (*Clostridium tetani*)
- la toxine botulique (*Clostridium botulinum*)
- la toxine diphtérique (*Corynebacterium diphtheriae*)
- la toxine de l'Anthrax (*Bacillus anthracis*)
- la toxine pertussique (*Bordetella pertussis*),
- la toxine cholérique,
- les toxines du staphylocoque, et
- les saxitoxines.

Avantageusement, l'invention concerne une composition telle que définie précédemment, dans laquelle, lesdits anticorps ne possèdent pas nécessairement de propriétés de neutralisation de ladite toxine circulante. En effet, lesdits anticorps sont capables de reconnaître un ou plusieurs épitopes de la toxine circulante, selon qu'ils sont monoclonaux ou polyclonaux et bien qu'ils reconnaissent spécifiquement la toxine, ils ne bloquent pas son activité. Les anticorps de l'invention sont donc très efficaces non pas par leur propriétés neutralisantes, mais par leur capacité accrue à interagir avec les récepteurs FcγRIII, et ainsi éliminer la toxine de la circulation de l'organisme contaminé.

Dans un autre mode de réalisation avantageux, l'invention concerne une composition susmentionnée, où l'infection bactérienne liée à la libération de ladite toxine est choisie parmi : le tétanos, le botulisme, la diphtérie, la coqueluche, la maladie du charbon, le choléra, les infections aux staphylocoques, les intoxications dues aux saxitoxines.

L'homme de métier sait que la toxine tétanique est responsable du tétanos, la toxine botulique est responsable du botulisme, la toxine diphtérique est responsable de la diphtérie, la toxine pertussique est responsable de coqueluche, la toxine de l'Anthrax est responsable de la maladie du charbon, la toxine cholérique responsable du choléra, peut entraîner des œdèmes pulmonaires engendrant des syndromes de détresse respiratoire

aigüe, la toxine staphylococcique est responsable notamment d'intoxications alimentaires, les saxitoxines sont responsables de déficiences respiratoires et/ou paralysies.

5 Dans encore un autre mode de réalisation avantageux, l'invention concerne une composition définie précédemment, où ladite composition est utilisée à des doses variant de environ 0,05mg/m² à 2000mg/m², en particulier de 10mg/m² à environ 2000mg/m², en particulier, la dose unitaire administrée peut varier de 15mg à environ 3g par patient.

10 La composition de l'invention se présente sous forme de liquide injectable ou sous forme de spray.

La composition de l'invention est administrée notamment par voie intraveineuse, lorsqu'elle se présente sous forme d'un liquide injectable. Elle peut-être administrée par les voies respiratoires lorsqu'elle se présente sous forme de spray.

15 L'administration de ladite composition peut être continue au moyen d'une perfusion intraveineuse, délivrant ladite composition soit à débit constant soit à débit variable sur quelques heures à plusieurs jours. L'administration de ladite composition peut également se faire de façon discontinue ou séquentielle, par une ou plusieurs prises ou injections quotidiennes, éventuellement renouvelées sur plusieurs jours.

20 Dans un autre mode de réalisation avantageux, l'invention concerne une composition telle que définie précédemment en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

25 La composition d'anticorps selon l'invention peut également être couplée à un traitement antibiotique afin d'éliminer rapidement de la circulation, les toxines libérées lors de la lyse bactérienne engendrée par le traitement antibiotique. La composition d'anticorps selon l'invention est tout particulièrement conseillée dans le cadre d'un traitement antibiotique visant une infection à bactérie à gram négatif qui en se lisant, vont libérer de manière massive les endotoxines contenues dans leurs parois.

30

L'invention concerne également une composition telle que définie précédemment, en association avec au moins un anticorps dirigé contre au moins un épitope d'une protéine exprimée à la surface de la bactérie produisant ladite toxine bactérienne circulante.

Ainsi, la composition selon l'invention comprend :

- des anticorps anti toxine, tels que définis précédemment, capables de capturer une toxine circulante, et de l'éliminer par phagocytose, et
- au moins un anticorps capable de reconnaître au moins un épitope d'une protéine exprimée à la surface d'une bactérie exprimant ladite toxine, ce second anticorps permettant la stimulation du système immunitaire et la lyse des bactéries.

En effet, certaines bactéries sont pathogènes par la libération de leur toxine mais également pas leur simple présence dans l'organisme. En conséquence, cette composition est très avantageuse car elle permet non seulement d'éliminer la toxine, nocive pour l'organisme, mais également d'empêcher la multiplication, ou la survie de la bactérie produisant ladite toxine.

L'anticorps dirigé contre au moins un épitope d'une protéine exprimée à la surface de la bactérie produisant la toxine est de préférence un anticorps présentant une capacité augmentée à lyser la bactérie. En d'autres termes, ledit anticorps présente une forte capacité à induire de l'ADCC.

Alternativement, l'invention concerne une composition telle que définie précédemment, en association avec au moins un anticorps neutralisant dirigé contre ladite toxine bactérienne circulante.

Encore plus avantageusement, l'invention concerne une composition précédemment décrite, en association :

- avec au moins un anticorps dirigé contre au moins un épitope d'une protéine exprimée à la surface de la bactérie produisant ladite toxine bactérienne circulante, et
- au moins un anticorps neutralisant dirigé contre ladite toxine bactérienne circulante.

La composition susmentionnée comprend donc trois types d'anticorps :

- des anticorps anti toxine, tels que définis précédemment, capables de capturer la toxine circulante, et de l'éliminer par phagocytose,
- au moins un anticorps neutralisant, dont l'effet est d'empêcher la toxine circulante d'exercer son effet nocif, sans pour autant permettre l'élimination de la toxine circulante, et

- au moins un anticorps capable de reconnaître au moins un épitope d'une protéine exprimée à la surface d'une bactérie exprimant ladite toxine, ce second anticorps permettant la stimulation du système immunitaire et la lyse des bactéries.

5

Cette composition est très avantageuse car elle permet de neutraliser la toxine, l'éliminer par phagocytose et éliminer la bactérie produisant ladite toxine.

Dans un autre mode de réalisation avantageux, l'invention concerne une composition telle que définie précédemment, où lesdits anticorps et

10

- ledit antibiotique, et/ou
- ledit anticorps dirigé contre au moins un épitope d'une protéine exprimée à la surface de la bactérie produisant ladite toxine bactérienne circulante, et/ou

15

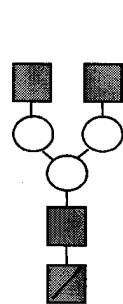
- ledit anticorps neutralisant dirigé contre ladite toxine bactérienne circulante

sont utilisés de manière simultanée, séquentielle ou séparée dans le temps.

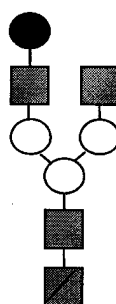
20

Revendications

1. Composition comprenant des anticorps monoclonaux dirigés contre une cytokine pro-inflammatoire circulante, lesdits anticorps ayant une forte affinité pour le récepteur FcγRIIIa (CD16), pour son utilisation dans le cadre de la prévention ou du traitement des phases précoces de l'inflammation.
2. Composition selon la revendication 1, lesdits anticorps ayant une affinité au moins égale à $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, au moins égale à $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ou $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, telle que déterminée par l'analyse Scatchard ou la technologie BIAcore (Label-free surface plasmon resonance based technology).
3. Composition selon la revendication 1 ou 2, le taux de fucose de l'ensemble des anticorps de ladite composition étant inférieur à 60%, et de préférence inférieur à 50%, pour son utilisation dans le cadre de la prévention ou du traitement des phases précoces de l'inflammation.
4. Composition selon la revendication 3, caractérisée en ce que chacun des anticorps possède sur le site de glycosylation en position 297 de ses chaînes lourdes, l'une des formes glycaniques biantennées choisie parmi les structures suivantes :



G0, et

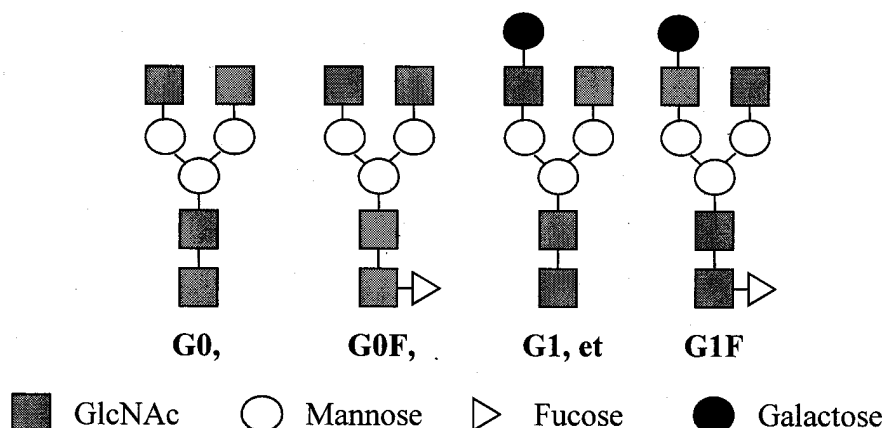


G1

 et  GlcNAc  Mannose  Galactose

le GlcNAc représenté par  dans les structures G0 et G1 ci-dessus étant susceptible d'être fucosylé.

5. Composition selon la revendication 3 ou 4, caractérisée en ce que chacun des anticorps possède sur le site de glycosylation en position 297 de ses chaînes lourdes, l'une des formes glycaniques biantennées choisie parmi les structures suivantes :



6. Composition selon la revendication 5, caractérisée en ce que les formes G0F + G1F des anticorps de ladite composition représentent moins de 50% des structures glycaniques portées par le site de glycosylation en position 297 de la chaîne lourde (Asn 297).
7. Composition selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, caractérisée en ce que les formes G0 + G1 + G0F + G1F des anticorps de ladite composition représentent plus de 60% desdites structures glycaniques et de préférence plus de 80% des structures glycaniques portées par le site de glycosylation en position 297 de la chaîne lourde (Asn 297).
8. Composition selon l'une quelconque des revendications 3 à 7, caractérisée en ce que chaque anticorps monoclonal compris dans ladite composition possède une affinité pour les récepteurs FcγRIII au moins 1.5 fois supérieure à celle d'un anticorps naturel dirigé contre ladite cytokine pro-inflammatoire circulante.
9. Composition selon l'une quelconque des revendications 3 à 8, caractérisée en ce que ladite cytokine pro-inflammatoire est choisie parmi les cytokines pro-inflammatoires suivantes :
- TNF- α ,
 - IL-1 β ,

- IL-6,
- IL-8,
- IL-10,
- IL-12,
 - IL-17
 - IL-18
 - GM-CSF

10. Composition selon l'une quelconque des revendications 3 à 9, ledit anticorps étant sous forme injectable, ou sous forme de spray.

11. Composition selon l'une quelconque des revendications 3 à 10, ledit anticorps étant associé à un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

12. Composition selon l'une quelconque des revendications 3 à 11, en association avec au moins un agent anti inflammatoire choisi parmi les corticoïdes et les anti-inflammatoires non-stéroïdiens.



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 778036
FR 1262178

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 2008/145866 A1 (LFB BIOTECHNOLOGIES [FR]; DE ROMEU CHRISTOPHE [FR]; FOURNIER NATHALIE) 4 décembre 2008 (2008-12-04)	1-12	A61K39/395 A61P29/00 C07K16/24
Y	* revendications 1-8,11-14,21-24 *	1-12	
X	US 2010/234574 A1 (CHAMBERLAIN AARON KEITH [US] ET AL) 16 septembre 2010 (2010-09-16)	1-12	
Y	* alinéas [0131], [0181], [0064]; revendication 4; exemple 2 *	1-12	
X	US 2012/088905 A1 (CHAMBERLAIN AARON KEITH [US] ET AL) 12 avril 2012 (2012-04-12)	1-12	
	* alinéa [0131] - alinéa [0132] *		
X	WO 2010/088444 A1 (MEDIMMUNE LLC [US]; BOWEN MICHAEL [US]; WU HERREN [US]; DALL ACQUA WIL) 5 août 2010 (2010-08-05)	1-12	
	* revendications 1-19,33-39 *		
X	STROHL ET AL: "Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies", CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, LONDON, GB, vol. 20, no. 6, 1 décembre 2009 (2009-12-01), pages 685-691, XP026778879, ISSN: 0958-1669, DOI: 10.1016/J.COPBIO.2009.10.011 [extrait le 2009-11-04] * page 689, dernière ligne, dernier alinéa - ligne 1, alinéa r; tableau 3 *	1-12	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) C07K A61K A61P
E	WO 2013/011076 A2 (GLAXO GROUP LTD [GB]; ELLIS JONATHAN HENRY [GB]; MOLLOY MICHAEL J [GB]) 24 janvier 2013 (2013-01-24)	1-12	
	* revendications 24,31; exemples 1,2; tableau 11 *		
		-/--	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
12 septembre 2013		Siaterli, Maria	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 778036
FR 1262178

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	CHAN ANDREW C ET AL: "Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, NATURE PUB. GROUP, vol. 10, no. 5, 1 mai 2010 (2010-05-01), pages 301-316, XP002665072, ISSN: 1474-1733, DOI: 10.1038/NRI2761 * page 311, colonne de gauche, alinéa 3 - page 312, colonne de droite, alinéa 3; figure 1; tableaux 1, box 1 * -----	1-12	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
12 septembre 2013		Siaterli, Maria	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE **RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1262178 FA 778036**

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

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **12-09-2013**

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

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2008145866 A1	04-12-2008	AR 066411 A1	19-08-2009
		AU 2008257271 A1	04-12-2008
		BR PI0804507 A2	30-08-2011
		CA 2685057 A1	04-12-2008
		CN 101784284 A	21-07-2010
		EP 2152311 A1	17-02-2010
		FR 2915398 A1	31-10-2008
		JP 2010525037 A	22-07-2010
		KR 20100021405 A	24-02-2010
		TW 200902038 A	16-01-2009
		US 2010143370 A1	10-06-2010
		WO 2008145866 A1	04-12-2008

US 2010234574 A1	16-09-2010	US 2009163699 A1	25-06-2009
		US 2010204454 A1	12-08-2010
		US 2010234571 A1	16-09-2010
		US 2010234572 A1	16-09-2010
		US 2010234573 A1	16-09-2010
		US 2010234574 A1	16-09-2010
		US 2010234575 A1	16-09-2010
		US 2011110928 A1	12-05-2011
		US 2012088905 A1	12-04-2012

US 2012088905 A1	12-04-2012	US 2009163699 A1	25-06-2009
		US 2010204454 A1	12-08-2010
		US 2010234571 A1	16-09-2010
		US 2010234572 A1	16-09-2010
		US 2010234573 A1	16-09-2010
		US 2010234574 A1	16-09-2010
		US 2010234575 A1	16-09-2010
		US 2011110928 A1	12-05-2011
		US 2012088905 A1	12-04-2012

WO 2010088444 A1	05-08-2010	AU 2010208125 A1	21-07-2011
		CA 2749200 A1	05-08-2010
		CN 102387814 A	21-03-2012
		EP 2391384 A1	07-12-2011
		JP 2012516158 A	19-07-2012
		KR 20110108398 A	05-10-2011
		SG 172354 A1	28-07-2011
		US 2012034212 A1	09-02-2012
		WO 2010088444 A1	05-08-2010

WO 2013011076 A2	24-01-2013	AUCUN	
