

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

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
18 septembre 2014 (18.09.2014)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2014/140322 A1

- (51) Classification internationale des brevets :
A61K 39/395 (2006.01) C07K 1/16 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2014/055179
- (22) Date de dépôt international :
14 mars 2014 (14.03.2014)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
1352360 15 mars 2013 (15.03.2013) FR
- (71) Déposant : LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES [FR/FR]; Zone d'activité de Courtaboeuf, 3, avenue des Tropiques, F-91940 Les Ulis (FR).
- (72) Inventeurs : CHEVREUX, Guillaume; 66, rue des Martyrs, F-75009 Paris (FR). BIHOREAU, Nicolas; 36, avenue Parrat, F-91400 Orsay (FR).
- (74) Mandataire : REGIMBEAU; 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, 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).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) Title : NOVEL MEDICAMENTS COMPRISING AN ANTIBODY COMPOSITION ENRICHED WITH PREDOMINANT CHARGE ISOFORM

(54) Titre : NOUVEAUX MÉDICAMENTS COMPRENANT UNE COMPOSITION D'ANTICORPS ENRICHIE EN ISOFORME DE CHARGE MAJORITAIRE

(57) Abstract : The present invention lies in the technical field of antibody therapies involving a mechanism of target-cell destruction by ADCC. It relates to purified antibody compositions, obtained by chromatographic fractionation of the various charge isoforms naturally present in an antibody composition and combining one or more chromatographic fractions corresponding to the predominant peak of the chromatogram, the resulting monoclonal antibody composition being enriched in said predominant peak, said peak representing at least 85% of the chromatogram of the composition obtained, for use as a medicament.

(57) Abrégé : La présente invention se situe dans le domaine technique des thérapies par anticorps impliquant un mécanisme de destruction de cellules cibles par ADCC. Elle concerne des compositions d'anticorps purifiées, obtenues par fractionnement par chromatographie des différentes isoformes de charge naturellement présentes dans une composition d'anticorps et regroupement d'une ou plusieurs fractions chromatographiques correspondant au pic majoritaire du chromatogramme, la composition d'anticorps monoclonal ainsi obtenue étant enrichie dans ledit pic majoritaire, celui-ci représentant au moins 85% du chromatogramme de la composition obtenue, pour une utilisation en tant que médicament.



WO 2014/140322 A1

Nouveaux médicaments comprenant une composition d'anticorps enrichie en isoforme de charge majoritaire

5

Domaine de l'invention

La présente invention se situe dans le domaine technique des thérapies par anticorps impliquant un mécanisme de destruction de cellules cibles par ADCC. Elle concerne des compositions d'anticorps purifiées, obtenues par fractionnement par chromatographie des différentes isoformes de charge naturellement présentes dans
10 une composition d'anticorps et regroupement d'une ou plusieurs fractions chromatographiques correspondant au pic majoritaire du chromatogramme, la composition d'anticorps monoclonal ainsi obtenue étant enrichie dans ledit pic majoritaire, celui-ci représentant au moins 85% du chromatogramme de la composition obtenue, pour une utilisation en tant que médicament.

15

Art antérieur

On a assisté au cours de la dernière décennie à un fort développement des traitements d'immunothérapie passive à l'aide d'anticorps, souvent monoclonaux, dans différents domaines thérapeutiques : cancers, prévention de l'alloimmunisation chez les femmes enceintes Rhésus-négatives, maladies infectieuses, maladies
20 inflammatoires et notamment autoimmunes.

Bien que les traitements d'immunothérapie passive à l'aide d'anticorps aient aujourd'hui démontré leur intérêt thérapeutique, les niveaux de réponse clinique observés sont encore insuffisants, et il existe donc un besoin pour des compositions d'anticorps plus efficaces, permettant d'augmenter les réponses cliniques et
25 d'administrer des doses plus faibles, afin de limiter les effets secondaires.

Comme tout produit biologique, une composition d'anticorps est par nature hétérogène. En effet, les compositions d'anticorps utilisées en thérapie sont produites dans des systèmes biologiques (cellules, animaux ou plantes transgéniques), dans lesquels les protéines en général, et donc les anticorps en
30 particuliers, sont soumis à un certain nombre de modifications post-traductionnelles (modifications enzymatiques ou dégradations), qui vont varier d'une molécule d'anticorps à une autre et générer ainsi une micro-hétérogénéité au sein de la composition d'anticorps produite.

Les anticorps sont des glycoprotéines constituées de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes (dites « H » pour « heavy ») généralement
35

identiques et deux chaînes légères (dites « L » pour « light ») généralement identiques associées par un nombre variable de ponts disulfures et des interactions non covalentes. Ces chaînes forment une structure en Y, la chaîne lourde contribuant au tronc du Y et à la moitié de chaque bras du Y, la chaîne légère contribuant à la moitié de chaque bras du Y. Chaque chaîne légère est constituée d'un domaine constant (C_L) et d'un domaine variable (V_L); les chaînes lourdes sont composées d'un fragment variable (V_H) et de 3 ou 4 fragments constants (C_{H1} à C_{H3} ou C_{H4}) selon l'isotype de l'anticorps (les IgG comprennent 3 fragments constants C_{H1} à C_{H3}). L'association de la chaîne légère (V_L+C_L) et des domaines V_H et C_{H1} de la chaîne lourde forment le fragment Fab, les domaines VL et VH associés étant responsables de la reconnaissance de l'antigène. Les domaines constants (C_{H2} et C_{H3}) ou (C_{H2} à C_{H4}) des deux chaînes lourdes forment le fragment constant Fc.

Les anticorps sont connus pour être soumis aux modifications post-traductionnelles suivantes : modifications terminales des chaînes lourdes ou légères, glycosylation de la partie Fc (et éventuellement des Fab), déamidation, isomérisation, oxydation, fragmentation, et agrégation (voir Vlasak et al-2008).

La plupart des modifications post-traductionnelles conduisent à une altération des propriétés de charge de surface de l'anticorps, soit directement en modifiant le nombre de groupes chargés, soit indirectement en introduisant des modifications structurales, qui elles-mêmes modifient la distribution locale des résidus chargés ou changent leur pKa. Toutes ces modifications génèrent donc également une micro-hétérogénéité, de nombreuses isoformes de charges différentes d'un même anticorps, avec des points isoélectriques (pI) distincts, cohabitant ainsi au sein d'une composition d'anticorps (voir Vlasak et al-2008).

Parmi les modifications post-traductionnelles, la glycosylation de la partie constante Fc des anticorps est aujourd'hui bien connue pour influencer fortement de nombreuses propriétés biologiques de l'anticorps : demi-vie *in vivo* (voir Wright et al-1994), capacité à induire une réponse ADCC (réponse cellulaire cytotoxique dépendante de l'anticorps, voir Satoh et al-2006, Presta et al-2006), une réponse CDC (réponse cytotoxique dépendante du complément, voir Wright et al-1994, Presta et al-2006), etc... En particulier, la teneur de la composition d'anticorps en formes glycaniques fucosylées est aujourd'hui connue pour affecter très fortement la capacité de la composition à induire une réponse ADCC *in vivo*.

Au contraire, bien que de nombreux articles visent à caractériser les isoformes de charge présents dans une composition d'anticorps pour justifier de la reproductibilité et de la qualité des lots commerciaux d'anticorps monoclonaux, les autres modifications post-traductionnelles conduisant à l'existence de nombreuses isoformes de charge distinctes d'un même anticorps au sein d'une composition

d'anticorps ont jusqu'ici été considérées comme ayant peu ou pas d'impact sur les propriétés biologiques des anticorps *in vivo*. Ainsi, bien qu'il soit généralement considéré comme indispensable dans l'art antérieur de faire un suivi qualité des lots commerciaux d'anticorps sur le plan des isoformes de charge, ce suivi est considéré

5 comme un pur suivi de qualité des produits et il n'a jamais été proposé d'utiliser une fraction purifiée d'une composition d'anticorps, fortement enrichie en un isoforme de charge particulier, dans un but thérapeutique. En effet, en absence de mise en évidence d'un effet significatif sur au moins certaines propriétés biologiques de la composition d'anticorps, il n'y avait aucune raison de ne pas utiliser la composition

10 entière, de compliquer le procédé de préparation et diminuer le rendement. Or, comme indiqué ci-dessus, à l'exception de la glycosylation, les autres modifications post-traductionnelles conduisant à l'existence de nombreuses isoformes de charge distinctes d'un même anticorps au sein d'une composition d'anticorps étaient jusqu'ici considérées comme n'altérant pas les propriétés biologiques des anticorps.

15 L'une des modifications conduisant à l'apparition de plusieurs isoformes de charge est le clivage enzymatique de la lysine C-terminale au niveau des chaînes lourdes de l'anticorps. Un tel clivage se produit, à différents degrés selon les molécules d'anticorps, dès que l'anticorps est produit dans une cellule exprimant une carboxypeptidase. La présence d'une lysine C-terminale confère un caractère plutôt

20 basique, du fait de la chaîne latérale de la lysine. Son clivage sur l'une et/ou l'autre chaîne lourde génère donc des isoformes plus acides. Il existe généralement des isoformes avec 0, 1 ou 2 lysines C-terminales sur les chaînes lourdes, créant ainsi trois isoformes avec des pI légèrement différents (voir Vlasak et al-2008). Sur cette modification particulière, Antes et al-2007 décrit l'analyse par focalisation

25 isoélectrique (IEF) de lots d'un anticorps monoclonal humanisé anti-Lewis-Y IGN311 utilisé dans l'immunothérapie passive des cancers produits en présence ou en absence de sérum. Les auteurs montrent que les profils d'isoformes de charge des compositions d'anticorps produites en présence et en absence de sérum sont différents, la composition produite en absence de sérum étant moins affectée que

30 celle produite en présence de sérum par le clivage enzymatique de la lysine C-terminale de la chaîne lourde de l'anticorps. L'analyse de l'effet de cette modification sur les capacités respectives des deux compositions à induire une réponse CDC (via le complément) n'a pas montré d'effet significatif lié à cette modification.

35 Un autre type de modification conduisant à l'apparition de plusieurs isoformes de charge au sein d'une composition d'anticorps est la cyclisation de résidus glutamine ou acide glutamique N-terminaux, qui conduit à la formation d'un groupement pyroglutamate (pE) et donc à des isoformes plus acides. Cette modification se produit de façon systématique, à différents degrés, dans toute composition

d'anticorps, mais n'est pas considérée comme susceptible d'affecter les propriétés fonctionnelles de l'anticorps (voir Vlasak et al-2008).

Encore un autre type de modification conduisant à l'apparition de plusieurs isoformes de charge au sein d'une composition d'anticorps est la formation d'adduits covalents et notamment les phénomènes de glycation (ajout non enzymatique de sucres), en particulier sur les résidus lysine, qui génèrent des isoformes plus acides. Ce type de modification est également considéré comme n'étant pas susceptible d'affecter les propriétés fonctionnelles de l'anticorps (voir Vlasak et al-2008).

Un autre type usuel de modification conduisant à l'apparition de plusieurs isoformes de charge au sein d'une composition d'anticorps est la déamidation de résidus asparagine et l'isomérisation de résidus aspartate, qui génère des isoformes plus acides. Dans la partie constante des anticorps, les résidus asparagine sensibles aux phénomènes de déamidation sont situés dans le domaine CH3, loin des sites de liaison au récepteur FcRn et aux récepteurs FcγR. Ces modifications sont donc généralement considérées comme n'étant pas susceptible d'affecter les propriétés fonctionnelles de l'anticorps (voir Vlasak et al-2008).

Khawli et al-2010 et Gandhi et al-2011 décrivent la séparation par des techniques de chromatographie utilisant une résine échangeuse de cations des isoformes acides, majoritaire, et basiques d'une composition d'anticorps monoclonal utilisé une immunothérapie passive ; l'analyse des modifications post-traductionnelles conduisant à l'existence de plusieurs isoformes ; ainsi que l'étude des propriétés pharmacocinétiques et de certaines propriétés fonctionnelles de trois fractions purifiées (acide, majoritaire et basique). Dans les deux cas, le chromatogramme de la composition native montre, comme toujours, un pic majoritaire, entouré de pics comprenant des isoformes acides et de pics comprenant des isoformes basiques. Les modifications post-traductionnelles identifiées incluent notamment la réduction de certains ponts disulfures (Khawli et al-2010), des glycations (Khawli et al-2010 ; Gandhi et al-2011), des déamidations (Khawli et al-2010 ; Gandhi et al-2011), le clivage de lysines C-terminales des chaînes lourdes (Khawli et al-2010 ; Gandhi et al-2011), la présence d'aggrégats (Gandhi et al-2011), des phénomènes d'oxydation (Gandhi et al-2011). L'analyse des propriétés pharmacocinétique (liaison FcRn et test *in vivo* dans Khawli et al-2010) n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative de comportement au niveau des trois fractions purifiées testées. Dans les deux articles, la capacité des trois fractions purifiées à inhiber *in vitro* la prolifération d'une lignée cellulaire exprimant l'antigène dont l'anticorps est spécifique, en absence de cellules effectrices, a également été testée. Un tel test permet de mettre en évidence la capacité de liaison à l'antigène et d'induction

d'apoptose. Bien que la fraction acide ait dans les deux articles une capacité très légèrement inférieure, les résultats ne sont pas significatifs et aucune différence significative n'a donc été observée entre les trois fractions purifiées. De plus, la fraction enrichie en isoforme majoritaire n'a pas de capacités améliorées par rapport à la composition d'anticorps totale, avant séparation des trois fractions.

Par ailleurs, d'autres documents décrivent comment analyser et/ou séparer certains isoformes de charge d'anticorps, mais sans comparer les propriétés effectrices des différentes isoformes. Ainsi, EP1308456 et WO2004/024866 décrivent des procédés chromatographiques visant à éliminer les variants acides d'une composition d'anticorps monoclonal, sans que les propriétés effectrices de la composition avant et après purification n'aient été testées. De même, WO2011/009623 décrit un procédé chromatographique visant à éliminer les variants acides ou les variants basiques d'une composition d'anticorps monoclonal, sans que les propriétés effectrices de la composition avant et après purification n'aient été testées. De plus, le procédé décrit dans ce document ne permet d'éliminer qu'un seul type de variant et seule l'élimination des variants acides est effectivement mise en œuvre.

Ainsi, à l'exception de la glycosylation, qui est connue pour avoir des effets sur les propriétés fonctionnelles des anticorps, les éléments disponibles dans l'art antérieur concernant les autres modifications post-traductionnelles conduisant à l'obtention de plusieurs isoformes de charge (provenant de différentes modifications apportées à l'isoforme majoritaire), suggèrent que ces modifications n'ont pas d'impact sur les propriétés fonctionnelles des anticorps.

Pourtant, les inventeurs ont trouvé de façon surprenante qu'une fraction purifiée par chromatographie, enrichie en l'isoforme de charge majoritaire d'une composition d'anticorps, possède une capacité significativement plus forte à induire une réponse effectrice via le récepteur CD16 par les cellules effectrices exprimant ce récepteur. Ainsi, une fraction purifiée enrichie en l'isoforme de charge majoritaire d'une composition d'anticorps permet d'induire une plus forte réponse ADCC et une plus forte réponse CDC *in vivo*, et donc d'augmenter les réponses cliniques et/ou de diminuer les doses administrées, limitant ainsi les effets secondaires.

Résumé de l'invention

La présente invention concerne donc une composition d'anticorps monoclonal susceptible d'être obtenue par un procédé comprenant :

- a) la production d'une composition d'anticorps monoclonal à partir d'un clone cellulaire, d'un animal non-humain transgénique ou d'une plante transgénique,
- b) le fractionnement de la composition obtenue à l'étape a) par chromatographie, et

- c) le regroupement d'une ou plusieurs fractions chromatographiques obtenues à l'étape b), correspondant au pic majoritaire du chromatogramme, la composition d'anticorps monoclonal ainsi obtenue étant enrichie dans ledit pic majoritaire, celui-ci représentant au moins 85%, avantageusement au moins 86%,
5 au moins 87%, au moins 88%, au moins 89%, plus avantageusement au moins 90%, au moins 91%, au moins 92%, au moins 93%, au moins 94%, voire au moins 95%, au moins 96%, au moins 97%, au moins 98%, au moins 98,5%, au moins 99%, ou au moins 99,5% du chromatogramme de la composition obtenue à l'étape c),
10 pour son utilisation en tant que médicament.
Avantageusement, l'étape b) est réalisée par fractionnement de la composition obtenue à l'étape a) par chromatographie échangeuse d'ions classique, par chromatofocalisation, ou par chromatographie d'interactions hydrophobes.
Avantageusement, la chromatographie échangeuse d'ions utilise l'un des moyens
15 d'élution suivants :
- gradient de force ionique ; et/ou
 - gradient de pH ; ou
 - molécule de déplacement.
- Avantageusement, dans une telle composition pour une utilisation en tant que
20 médicament, au moins 95%, avantageusement au moins 96%, au moins 97%, au moins 98%, voire au moins 98,5%, au moins 99%, ou au moins 99,5% des chaînes lourdes des anticorps présents dans la composition ne comprennent pas de résidu lysine en C-terminal.
- L'invention concerne également une composition d'anticorps monoclonal, dans
25 laquelle au moins 95%, avantageusement au moins 96%, au moins 97%, au moins 98%, voire au moins 98,5%, au moins 99%, ou au moins 99,5% des chaînes lourdes des anticorps présents dans la composition ne comprennent pas de résidu lysine en C-terminal, pour son utilisation en tant que médicament.
- Dans les compositions pour une utilisation en tant que médicament selon l'invention,
30 l'anticorps est avantageusement dirigé contre un antigène non ubiquitaire présent sur des cellules de donneur sain, un antigène d'une cellule cancéreuse, ou un antigène d'une cellule infectée par agent pathogène.
- En particulier, les modes de réalisation suivant sont préférés :
- l'anticorps est un anticorps anti-Rhésus D et la composition est destinée à la
35 prévention de l'alloimmunisation chez les individus Rhésus-négatifs.
 - l'anticorps est dirigé contre un antigène d'une cellule cancéreuse et la composition est destinée au traitement d'un cancer,

- l'anticorps est dirigé contre un antigène d'une cellule infectée par un agent pathogène et la composition est destinée au traitement d'une infection par ledit organisme pathogène,
- l'anticorps est dirigé contre un antigène d'une cellule immunitaire et la composition est destinée au traitement d'une maladie auto-immune.

5

Dans un mode de réalisation avantageux, dans une composition pour une utilisation en tant que médicament selon l'invention, l'anticorps comprend une modification du fragment Fc augmentant sa liaison au récepteur Fc γ RIII et ses propriétés effectrices via le récepteur Fc γ RIII. La composition pour une utilisation en tant que médicament

10 selon l'invention peut notamment comprendre des mutations dans le fragment Fc augmentant sa liaison au récepteur Fc γ RIII et/ou une faible teneur en fucose. En particulier, avantageusement, les anticorps présents dans la composition possèdent sur leurs sites de N-glycosylation du fragment Fc des structures glycaniques de type biantenné, avec une teneur en fucose inférieure à 65%.

10

15

Dans un mode de réalisation avantageux, dans une composition pour une utilisation en tant que médicament selon l'invention, l'anticorps comprend une modification du fragment Fc augmentant sa liaison à la protéine C1q et ses propriétés effectrices via le complément:

20

La présente invention concerne également l'utilisation d'une étape de fractionnement par chromatographie pour augmenter la capacité d'une composition d'anticorps monoclonal dirigé contre un anticorps donné à induire la cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC) de cellules cibles exprimant ledit antigène par les cellules effectrices du système immunitaire exprimant le récepteur Fc γ RIII (CD16).

25

La présente invention concerne également l'utilisation d'une étape de fractionnement par chromatographie pour augmenter la capacité d'une composition d'anticorps monoclonal dirigé contre un anticorps donné à induire la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) de cellules cibles exprimant ledit antigène par le complément.

30

Description des figures

35

Figure 1. Chromatogrammes obtenus pour trois séparations par chromatofocalisation d'une composition d'anticorps anti-CD20 (résine échangeuse d'anions (colonne Mono™ P commercialisée par GE Life Sciences) avec élution par un gradient descendant de pH (de 9,5 à 8,0 en utilisant deux tampons : tampon A (diéthanolamine 25 mM), tampon B (polybuffer 96 + pharmalyte 8-10,5)). La composition d'anticorps a été dessalée, et 20 mg ont été injectés sur la colonne.

Des fractions de 2 mL ont été collectées. Les fractions 33 à 50 ont été collectées pour analyse.

Figure 2. Superposition de 11 chromatogrammes correspondant à onze séparations par chromatographie échangeuse de cations (même colonne et élution que A). Les fractions F1 à F20 ont été collectées et regroupée par pics : P1 (acide, F1 à F3), P2 (acide, F4 et F5), P3 (acide, F6), P4 (pic principal, F7 à F10), P5 (basique, F11), P6 (basique, F12 à F14), P7 (basique, F15 à F17), et P8 (basique, F18 à F20).

Figure 3. Chromatogrammes de la composition d'anticorps anti-CD20 purifiée par CEX. A. Chromatogramme de la composition d'anticorps anti-CD20 avant purification. B. Chromatogramme de la composition formée par assemblage des fractions 1 à 20 correspondant au pic majoritaire du chromatogramme avant séparation (A). Le pourcentage des différents pics sont indiqués.

Figure 4. Liaison au CD16 (Biacore) des fractions purifiées par chromatographie échangeuse de cations. La liaison au CD16 de chaque échantillon est exprimée en pourcentage de la liaison au CD16 d'un échantillon de référence

Figure 5. Activité CD16 des fractions purifiées par chromatofocalisation (A) ou par chromatographie échangeuse de cations (B). L'activité CD16 (sécrétion d'IL-2 par les cellules Jurkat CD16) de chaque échantillon est exprimée en pourcentage de l'activité CD16 d'un échantillon de référence.

Figure 6. Cytotoxicité dépendante du complément (CDC) des fractions purifiées par chromatographie échangeuse de cations. La réponse CDC de chaque échantillon est exprimée en pourcentage de la réponse CDC d'un échantillon de référence.

Description détaillée de l'invention

La présente invention concerne donc une composition d'anticorps monoclonal susceptible d'être obtenue par un procédé comprenant :

- a) la production d'une composition d'anticorps monoclonal à partir d'un clone cellulaire, d'un animal non-humain transgénique ou d'une plante transgénique,
- b) le fractionnement de la composition obtenue à l'étape a) par chromatographie, et
- c) le regroupement d'une ou plusieurs fractions chromatographiques obtenues à l'étape b), correspondant au pic majoritaire du chromatogramme, la composition d'anticorps monoclonal ainsi obtenue étant enrichie dans ledit pic majoritaire, celui-ci représentant au moins 85%, avantageusement au moins 86%, au moins 87%, au moins 88%, au moins 89%, plus avantageusement au moins 90%, au moins 91%, au moins 92%, au moins 93%, au moins 94%, voire au moins 95%, au moins 96%, au moins 97%, au moins 98%, au moins 98,5%, au moins

99%, ou au moins 99,5% du chromatogramme de la composition obtenue à l'étape c),
pour son utilisation en tant que médicament.

- 5 A l'étape a), une composition d'anticorps monoclonal est produite à partir d'un clone cellulaire, d'un animal transgénique ou d'une plante transgénique.
Par « anticorps » ou « immunoglobuline », on entend une molécule comprenant au moins un domaine de liaison à un antigène donné et un domaine constant comprenant un fragment Fc capable de se lier aux récepteurs FcR. Chez la plupart
10 des mammifères, comme l'homme et la souris, un anticorps est composé de 4 chaînes polypeptidiques : 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères reliées entre elles par un nombre variable de ponts disulfures assurant une flexibilité à la molécule. Chaque chaîne légère est constituée d'un domaine constant (CL) et d'un domaine variable (VL); les chaînes lourdes étant composées d'un domaine variable (VH) et
15 de 3 ou 4 domaines constants (CH1 à CH3 ou CH1 à CH4) selon l'isotype de l'anticorps. Chez quelques rares mammifères, comme les chameaux et les lamas, les anticorps sont constitués de seulement deux chaînes lourdes, chaque chaîne lourde comprenant un domaine variable (VH) et une région constante.
Les domaines variables sont impliqués dans la reconnaissance de l'antigène, tandis
20 que les domaines constants sont impliqués dans les propriétés biologiques, pharmacocinétiques et effectrices, de l'anticorps.
Contrairement aux domaines variables dont la séquence varie fortement d'un anticorps à un autre, les domaines constants sont caractérisés par une séquence en acides aminés très proche d'un anticorps à l'autre, caractéristique de l'espèce et de
25 l'isotype, avec éventuellement quelques mutations somatiques. Le fragment Fc est naturellement composé de la région constante de la chaîne lourde à l'exclusion du domaine CH1, c'est-à-dire de la région charnière inférieure et des domaines constants CH2 et CH3 ou CH2 à CH4 (selon l'isotype). Chez les IgG1 humaines, le fragment Fc complet est composé de la partie C-terminale de la chaîne lourde à
30 partir du résidu cystéine en position 226 (C226), la numérotation des résidus d'acides aminés dans le fragment Fc étant dans toute la présente description celle de l'index EU décrit dans Edelman et al-1969 et Kabat et al-1991. Les fragments Fc correspondants d'autres types d'immunoglobulines peuvent être identifiés aisément par l'homme du métier par des alignements de séquences.
- 35 Le fragment Fc est glycosylé au niveau du domaine CH2 avec la présence, sur chacune des 2 chaînes lourdes, d'un *N*-glycane lié au résidu asparagine en position 297 (Asn 297).

Les domaines de liaison suivants, situés dans le Fc, sont importants pour les propriétés biologiques de l'anticorps :

- domaine de liaison au récepteur FcRn, impliqué dans les propriétés pharmacocinétiques (demi-vie *in vivo*) de l'anticorps :
- 5 Différentes données suggèrent que certains résidus situés à l'interface des domaines CH2 et CH3 sont impliqués dans la liaison au récepteur FcRn.
- domaine de liaison à la protéine du complément C1q, impliqué dans la réponse CDC (pour « cytotoxicité dépendante du complément ») : situé dans le domaine CH2;
- 10 - domaine de liaison aux récepteurs FcR, impliqué dans les réponses de type phagocytose ou ADCC (pour « cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps ») : situé dans le domaine CH2.

Au sens de l'invention, le fragment Fc d'un anticorps peut être naturel, tel que défini ci-dessus, ou bien avoir été modifié de diverses façons, à condition de comprendre un domaine de liaison aux récepteurs FcR (récepteurs Fc γ R pour les IgG) fonctionnel, et de préférence un domaine de liaison au récepteur FcRn fonctionnel. Les modifications peuvent inclure la délétion de certaines parties du fragment Fc, pourvu que celui-ci contienne un domaine de liaison aux récepteurs FcR (récepteurs Fc γ R pour les IgG) fonctionnel, et de préférence un domaine de liaison au récepteur FcRn fonctionnel. Les modifications peuvent également inclure différentes substitutions d'acides aminés susceptibles d'affecter les propriétés biologiques de l'anticorps, pourvu que celui-ci contienne un domaine de liaison aux récepteurs FcR fonctionnel, et de préférence un domaine de liaison au récepteur FcRn fonctionnel. En particulier, lorsque l'anticorps est un IgG, il peut comprendre des mutations destinées à augmenter la liaison au récepteur Fc γ RIII (CD16), telles que décrites dans WO00/42072, Shields et al-2001, Lazar et al-2006, WO2004/029207, WO/2004063351, WO2004/074455. Des mutations permettant d'augmenter la liaison au récepteur FcRn et donc la demi-vie *in vivo* peuvent également être présentes, comme décrit par exemple dans Shields et al-2001, Dall'Acqua et al-2002, Hinton et al-2004, Dall'Acqua et al-2006(a), WO00/42072, WO2/060919A2, WO2010/045193, ou WO2010/106180A2. D'autres mutations, comme celles permettant de diminuer ou d'augmenter la liaison aux protéines du complément et donc la réponse CDC, peuvent ou non être présentes (voir WO99/51642, WO2004074455A2, Idusogie et al-2001, Dall'Acqua et al-2006(b), et Moore et al-2010).

Par « anticorps monoclonal » ou « composition d'anticorps monoclonal », on entend une composition comprenant des molécules d'anticorps possédant une spécificité antigénique identique et unique. Les molécules d'anticorps présentes dans la

composition sont susceptibles de varier au niveau de leurs modifications post-traductionnelles, et notamment au niveau de leurs structures de glycosylation ou de leur point isolélectrique, mais ont toutes été codées par les mêmes séquences de chaînes lourde et légère et ont donc, avant toute modification post-traductionnelle, la même séquence protéique. Certaines différences de séquences protéique, liées à des modifications post-traductionnelles (comme par exemple le clivage de la lysine C-terminale de la chaîne lourde, la déamidation de résidus asparagine et/ou l'isomérisation de résidus aspartate), peuvent néanmoins exister entre les différentes molécules d'anticorps présentes dans la composition.

5 L'anticorps monoclonal présent dans la composition utilisée en tant que médicament dans le cadre de l'invention peut avantageusement être chimérique, humanisé, ou humain. En effet, cela permet d'éviter les réactions immunitaires du patient contre l'anticorps administré.

Par anticorps « chimérique », on entend désigner un anticorps qui contient une région variable (chaîne légère et chaîne lourde) naturelle dérivée d'un anticorps d'une espèce donnée en association avec les régions constantes de chaîne légère et chaîne lourde d'un anticorps d'une espèce hétérologue à ladite espèce donnée. Avantageusement, si la composition d'anticorps monoclonal pour son utilisation en tant que médicament selon l'invention comprend un anticorps monoclonal chimérique, celui-ci comprend des régions constantes humaines. Partant d'un anticorps non humain, un anticorps chimérique peut être préparé en utilisant les techniques de recombinaison génétique bien connues de l'homme du métier. Par exemple, l'anticorps chimérique pourra être réalisé en clonant pour la chaîne lourde et la chaîne légère un ADN recombinant comportant un promoteur et une séquence codant pour la région variable de l'anticorps non humain, et une séquence codant pour la région constante d'un anticorps humain. Pour les méthodes de préparation d'anticorps chimériques, on pourra par exemple se référer au document Verhoeyn et al-1988.

Par anticorps « humanisé », on entend désigner un anticorps qui contient des régions CDRs dérivées d'un anticorps d'origine non humaine, les autres parties de la molécule d'anticorps étant dérivées d'un (ou de plusieurs) anticorps humains. En outre, certains des résidus des segments du squelette (dénommés FR) peuvent être modifiés pour conserver l'affinité de liaison (Jones et al-1986 ; Verhoeyen et al-1988 ; Riechmann et al-1988). Les anticorps humanisés selon l'invention peuvent être préparés par des techniques connues de l'homme de l'art telles les technologies de « CDR grafting », de « resurfacing », de SuperHumanisation, de « Human string content », de « FR libraries », de « Guided selection », de « FR

shuffling » et de « Humaneering », comme résumé dans la revue de Almagro et al-2008.

Par anticorps « humain », on entend un anticorps dont toute la séquence est d'origine humaine, c'est-à-dire dont les séquences codantes ont été produites par recombinaison de gènes humains codant pour les anticorps. En effet, il est maintenant possible de produire des animaux transgéniques (par ex. des souris) qui sont capables, sur immunisation, de produire un répertoire complet d'anticorps humains en l'absence de production endogène d'immunoglobuline (voir Jakobovits et al-1993(a) et (b); Bruggermann et al-1993; et Duchosal et al-1992, U.S. patents 5,591,669, 5,598,369, 5,545,806, 5,545,807, 6,150,584). Les anticorps humains peuvent aussi être obtenus à partir de banques de présentation de phages (Hoogenboom et al-1991; Marks et al-1991; Vaughan et al-1996).

Les anticorps peuvent être plusieurs isotypes, en fonction de la nature de leur région constante : les régions constantes γ , α , μ , ϵ et δ correspondent respectivement aux immunoglobulines IgG, IgA, IgM, IgE et IgD. Avantageusement, l'anticorps monoclonal présent dans une composition utilisée en tant que médicament dans le cadre de l'invention est d'isotype IgG. En effet, cet isotype montre une capacité à engendrer une activité ADCC (« Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity », soit Cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps) chez le plus grand nombre d'individus (humains). Les régions constantes γ comprennent plusieurs sous-types : $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, ces trois types de régions constantes présentant la particularité de fixer le complément humain, et $\gamma 4$, créant ainsi les sous-isotypes IgG1, IgG2, IgG3, et IgG4. Avantageusement, l'anticorps monoclonal présent dans une composition utilisée en tant que médicament dans le cadre de l'invention est d'isotype IgG1 ou IgG3, de préférence IgG1.

La composition d'anticorps monoclonal peut être produite par un clone cellulaire, un animal non-humain transgénique ou une plante transgénique, par des technologies bien connues de l'homme du métier.

30

Notamment, des clones cellulaires produisant la composition peuvent être obtenus par 3 technologies principales :

- 1) Obtention d'un hybridome par fusion d'un lymphocyte B produisant l'anticorps d'intérêt avec une lignée immortalisée,
- 35 2) Immortalisation d'un lymphocyte B produisant l'anticorps d'intérêt par le virus Epstein-Barr (EBV),
- 3) Isolement des séquences codant pour un anticorps d'intérêt (généralement à partir d'un hybridome ou d'un lymphocyte B immortalisé), clonage dans un

ou plusieurs vecteur(s) d'expression des séquences codant pour les chaînes lourde et légère de l'anticorps, transformation d'une lignée cellulaire par le(s) vecteur(s) d'expression, et séparation des différents clones cellulaires obtenus. Un vecteur d'expression des chaînes lourde et légère de l'anticorps comprend les éléments nécessaires à l'expression des séquences codant pour les chaînes lourde et légère de l'anticorps, et notamment un promoteur, un codon d'initiation de la transcription, des séquences de terminaison, et des séquences de régulation de la transcription appropriées. Ces éléments varient en fonction de l'hôte servant pour l'expression et sont choisis aisément par l'homme du métier au vu de ses connaissances générales. Le vecteur peut notamment être plasmidique ou viral. Les techniques de transformations sont également bien connues de l'homme du métier.

La transformation de lignées cellulaires par un ou plusieurs vecteur(s) d'expression des séquences codant pour les chaînes lourde et légère de l'anticorps est la plus communément utilisée, en particulier pour l'obtention d'anticorps chimériques ou humanisés.

La lignée cellulaire transformée est de préférence d'origine eucaryote, et peut notamment être choisie parmi les cellules d'insecte, de plantes, de levure ou de mammifères. La composition d'anticorps peut alors être produite en cultivant la cellule hôte dans des conditions appropriées. Des lignées cellulaires appropriées pour la production d'anticorps incluent notamment les lignées choisies parmi : SP2/0 ; YB2/0 ; IR983F ; le myélome humain Namalwa ; PERC6 ; les lignées CHO, notamment CHO-K-1, CHO-Lec10, CHO-Lec1, CHO-Lec13, CHO Pro-5, CHO dhfr-, ou lignée CHO délétée pour les deux allèles codant pour le gène FUT8 et/ou le gène GMD ; Wil-2; Jurkat; Vero; Molt -4; COS-7; 293-HEK; BHK; K6H6; NSO; SP2/0-Ag 14, P3X63Ag8.653, lignée de cellule de canard embryonnaire EB66® (Vivalis); et lignées d'hépatome de rat H4-II-E (DSM ACC3129), H4-II-Es (DSM ACC3130) (voir WO2012/041768) Dans un mode de réalisation préféré, l'anticorps est produit dans l'une des lignées suivantes : YB2/0 ; lignée CHO délétée pour les deux allèles codant pour le gène FUT8 et/ou le gène GMD ; lignée de cellule de canard embryonnaire EB66® (Vivalis) ; et lignées d'hépatome de rat H4-II-E (DSM ACC3129), H4-II-Es (DSM ACC3130). Dans un mode de réalisation préféré, l'anticorps est produit dans YB2/0 (ATCC CRL-1662).

Alternativement, la composition d'anticorps peut être produite dans un animal non-humain transgénique.

Un animal non-humain transgénique peut être obtenu par injection directe du ou des gène(s) d'intérêt (ici, les gènes réarrangés codant pour les chaînes lourde et légère

de l'anticorps) dans un œuf fertilisé (Gordon et al-1980). Un animal non-humain transgénique peut également être obtenu par introduction du ou des gène(s) d'intérêt (ici, les gènes réarrangés codant pour les chaînes lourde et légère de l'anticorps) dans une cellule souche embryonnaire et préparation de l'animal par
5 une méthode d'agrégation de chimère ou une méthode d'injection de chimère (voir Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994); Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)). Un animal non-humain transgénique peut également être obtenu par une technique de clonage dans laquelle un noyau, dans
10 lequel le ou les gène(s) d'intérêt (ici, les gènes réarrangés codant pour les chaînes lourde et légère de l'anticorps) a été introduit, est transplanté dans un œuf énucléé (Ryan et al-1997; Cibelli et al-1998, WO0026357A2). Un animal non humain transgénique produisant un anticorps d'intérêt peut être préparé par les méthodes ci-dessus. L'anticorps peut alors être accumulé dans l'animal transgénique et
15 récolté, notamment à partir du lait ou des œufs de l'animal. Pour la production d'anticorps dans le lait d'animaux non humains transgéniques, des procédés de préparation sont notamment décrits dans WO9004036A1, WO9517085A1, WO0126455A1, WO2004050847A2, WO2005033281A2, WO2007048077A2. Des procédés de purification de protéines d'intérêt à partir du lait sont également connus
20 (voir WO0126455A1, WO2007106078A2). The animaux non humains transgéniques d'intérêt incluent notamment la souris, le lapin, le rat, la chèvre, les bovins (notamment la vache), et les volailles (notamment le poulet).

La composition d'anticorps peut être produite dans une plante transgénique. De
25 nombreux anticorps ont déjà été produits dans des plantes transgéniques et les technologies nécessaires à l'obtention d'une plante transgénique exprimant un anticorps d'intérêt et à la récupération de l'anticorps sont bien connues de l'homme du métier (voir Stoger et al-2002, Fisher et al-2003, Ma et al-2003, Schillberg et al-2005). Il est également possible d'influencer la glycosylation obtenue dans les
30 plantes pour obtenir une glycosylation proche de celle des anticorps humains naturels (sans xylose), mais avec en outre une faible fucosylation, par exemple à l'aide de petits ARNs interférents (Forthal et al-2010).

A l'étape b) du procédé permettant d'obtenir une composition d'anticorps
35 monoclonal destinée à être utilisée en tant que médicament selon l'invention, les différents isoformes de charge d'anticorps présents dans la composition obtenue à l'étape a) sont séparés par fractionnement de la composition obtenue à l'étape a) par chromatographie.

Comme expliqué en introduction, toute composition d'anticorps monoclonal produite par un clone cellulaire, un animal transgénique non humain ou une plante transgénique est caractérisée par la présence d'un certain nombre d'isoformes ou variants de charge d'un même anticorps monoclonal. La présence de ces différents isoformes ou variants de charge est liée à l'existence de modifications post-traductionnelles conduisant à une altération des propriétés de charge de surface de l'anticorps, soit directement en modifiant le nombre de groupes chargés, soit indirectement en introduisant des modifications structurales, qui elles-mêmes modifient la distribution locale des résidus chargés ou changent leur pKa. Chaque isoforme ou variant de charge est caractérisé par son point isoélectrique (pI, encore appelé potentiel hydrogène isoélectrique (pHI)), qui correspond au pH (potentiel hydrogène) pour lequel la charge globale de cette molécule est nulle ou, autrement dit, le pH pour lequel la molécule est électriquement neutre (forme zwitterionique ou ion mixte). A un pH donné, les différents isoformes ou variants de charge d'un anticorps monoclonal auront donc des charges nettes variables, ceux dont le pI est inférieur au pH portant une charge négative (la molécule a tendance à céder ses protons au milieu basique), ceux dont le pI est égal au pH étant neutres, et ceux dont le pI est supérieur au pH portant une charge positive (la molécule a tendance à conserver ses protons ou à en capter du milieu acide). Les différents isoformes ou variants de charge d'un anticorps monoclonal sont présents dans des proportions variables, en fonction de la fréquence des modifications post-traductionnelles présentes sur chaque variant. Une composition d'anticorps monoclonal comprend généralement un variant ou isoforme majoritaire, accompagné d'une pluralité de variants ou isoformes dits acides ou basiques, selon que leur pI est inférieur ou supérieur à celui de l'isoforme majoritaire. Selon l'anticorps, son mode de production et les étapes de purifications qu'il peut avoir déjà subies, les proportions des isoformes acides, du pic majoritaire et des isoformes basiques (calculés à partir du chromatogramme d'une chromatographie échangeuse d'ions), varient généralement autour des valeurs suivantes : 10 à 30% d'isoformes acides, 50 à 75% de pic majoritaire, et 8 à 20% d'isoformes basiques (voir Farnan et al-2009, Rea et al-2011, Rea et al-2012, Khawli et al-2010, Zhang et al-2011, WO2011/009623, et EP1308456).

Du fait de leurs différences en termes de pI et de charge nette à un pH donné, les isoformes de charge d'anticorps présentes dans une composition d'anticorps donnée peuvent être séparées par différentes technologies de chromatographie.

La chromatographie est une technique de séparation des substances chimiques (mélange homogène liquide ou gazeux) qui repose sur des différences de comportement entre une phase mobile courante et une phase stationnaire (ou

phase fixe). On peut classer les méthodes chromatographiques d'après la nature des phases utilisées ou celle des phénomènes mis en œuvre dans la séparation.

Dans un mode de réalisation de l'invention, le fractionnement de l'étape b) est réalisé à l'aide d'une chromatographie échangeuse d'ions. Cela permet en effet de
5 séparer les isoformes de charge d'une même protéine. Dans la chromatographie échangeuse d'ions (anions ou cations), le paramètre qui va permettre la séparation des différents constituants est leur charge nette.

La composition d'anticorps est d'abord chargée sur une résine échangeuse d'ions. Pour cela, on utilise des résines (phase fixe ou stationnaire) chargées positivement
10 (chromatographie échangeuse d'anions) ou négativement (chromatographie échangeuse de cations). Les molécules de charge opposée à celle des ions de la résine seront retenues/fixées sur la résine.

On peut utiliser tout type de résine échangeuse de cations ou d'anions, forte ou faible, connue de l'homme du métier et appropriée pour la séparation de la
15 composition d'anticorps d'intérêt. En fonction de sa séquence protéique, le point isoélectrique (pI) moyen d'une composition d'anticorps varie généralement entre 5 et 9, le plus souvent entre 7 et 9. Pour un pI supérieur à 8, une résine échangeuse de cations est utilisée. A l'inverse, pour un pI inférieur à 6, une résine échangeuse d'anions est utilisée. Pour un pI compris entre 6 et 8, les deux types de résines
20 échangeuses d'ions (cations ou anions) peuvent être testés. Ainsi, même si une chromatographie échangeuse de cations (résine chargée négativement) suivie d'une élution avec un gradient de force ionique est le plus souvent utilisée, il est également possible dans certains cas d'utiliser une chromatographie échangeuse d'anions (résine chargée positivement).

25 Les résines échangeuses d'ions sont généralement constituées d'un polymère réticulé ou gel, sur lequel des groupements chargés positivement (résine échangeuse d'anions) ou négativement (résine échangeuse de cations) sont greffés. Le polymère réticulé ou gel peut notamment être choisi parmi le dextrane (ex : Sephadex®), l'agarose (ex : Sepharose®), la cellulose, les polymères de
30 méthacrylate (ex : Fratogel®), les polymères vinyliques (ex : Fractoprep®) tels que le poly(styrène divinylbenzène) (ex : Monobeads™ ; Source™ ; Bio Mab NP-5 ou NP-10 ; Sepax Antibodix™ NP1.7, NP3, NP5 et NP10).

Le gel peut avantageusement se présenter sous forme de billes, avec un diamètre moyen compris entre 10 et 200 µm.

35 Pour les résines échangeuses de cations, des groupements chargés négativement sont greffés sur le polymère réticulé, tels que des groupements de type sulfopropyl (SP), méthyl sulfonate (S) ou carboxyméthyl (CM).

Pour les résines échangeuses d'anions, des groupements chargés positivement sont greffés sur le polymère réticulé, tels que des groupements de type ammonium quaternaire (Q), notamment aminoéthyle quaternaire (QAE), diéthylaminoéthyle (DEAE), diméthylaminoéthyle (DMAE), triméthylaminoéthyl (TMAE), ou diméthylaminopropyle (ANX).

Des résines échangeuses de cations susceptibles d'être utilisées dans le cadre de la présente invention incluent les résines Source™ 15S ou 30S, Mono-S (commercialisées par GE Life Sciences) ; ProPac® WCX (en particulier ProPac® WCX-10), ProPac® SCX (en particulier ProPac® SCX-10 ou SCX-20), ProSwift WCX, MAbPac® SCX (en particulier MAbPac® SCX-10) (commercialisées par Dionex) ; Bio Mab (en particulier Bio Mab NP-5 ou NP-10, commercialisées par Agilent), PL-SCX (commercialisées par Agilent) ; Sepax Antibodix™ (en particulier Sepax Antibodix™ NP1.7, NP3, NP5 et NP10) (commercialisées par Sepax) (voir Farnan et al-2009, Khawli et al-2010, Gandhi et al-2011, Zhang et al-2011, Rea et al-2011 et McAtee et al-2012). De même, des résines échangeuses d'anions susceptibles d'être utilisées dans le cadre de la présente invention incluent les résines Source™ 15Q ou 30Q, Mono™-Q (commercialisées par GE Life Sciences) ; ProPac® WAX (en particulier ProPac® WAX-10), ProPac® SAX (en particulier ProPac® SAX-10) (commercialisées par Dionex).

Une fois la composition d'anticorps chargée sur la résine échangeuse d'ions, différents modes d'élution peuvent être utilisés pour séparer les isoformes de charge.

L'élution des molécules fixées peut notamment être réalisée en utilisant un tampon d'élution (phase mobile) contenant des ions de charge opposée à celle des ions de la résine, qui vont entrer en compétition avec les molécules fixées pour interagir avec les charges portées par la résine. On peut soit utiliser directement un tampon contenant une forte concentration en ions (pour éluer toutes les molécules d'un coup) ou au contraire augmenter progressivement la concentration ionique (on parle alors de gradient de force ionique), ce qui permet de décrocher successivement les différentes molécules en fonction de la force de leurs interactions électrostatiques avec la résine. Pratiquement, dans ce dernier cas de figure, on utilise deux solutions tampon, l'une de faible concentration ionique et l'autre de forte concentration ionique. Deux pompes pilotées aspirent et mélangent ces deux solutions selon un rapport qui varie avec le temps (la proportion de solution de forte concentration ionique augmentant progressivement). Le produit de ce mélange est utilisé dans la colonne. Des exemples de procédés précis de séparation des isoformes de charges d'une composition d'anticorps par cette technologie sont décrits dans Gandhi et al-2011. Rea et al-2012 décrit également le principe de cette technologie, ainsi que

comment choisir de manière appropriée la colonne, les tampons et les paramètres d'opération pour séparer des isoformes ou variants de charge d'anticorps (voir section 7 pages 447-451).

5 Dans une variante de la chromatographie échangeuse d'ions l'élution est réalisée non pas à l'aide d'un gradient de force ionique, mais à l'aide d'un gradient de pH. En effet, de nombreux groupes ionisables sont sensibles au pH. Avec un gradient ascendant de pH (i.e. en augmentant le pH), on favorise l'ionisation des groupements acides (chargés négativement) et on défavorise l'ionisation des groupements basiques (chargés positivement). En augmentant le pH, on favorise
10 donc l'apparition d'une charge nette négative pour les molécules portant des groupes ionisables sensibles au pH. Un gradient ascendant de pH permet donc également de séparer les isoformes de charge d'une composition d'anticorps fixées sur une résine chargée négativement (échangeuse de cations). Avec un gradient descendant de pH (i.e. en diminuant le pH), on favorise l'ionisation des
15 groupements basiques (chargés positivement) et on défavorise l'ionisation des groupements acides (chargés négativement). En diminuant le pH, on favorise donc l'apparition d'une charge nette positive pour les molécules portant des groupes ionisables sensibles au pH. Un gradient descendant de pH permet donc également de séparer les isoformes de charges d'une composition d'anticorps fixées sur une
20 résine chargée positivement (échangeuse d'anions). Des exemples de procédés précis de séparation des isoformes de charges d'anticorps par chromatographie échangeuse d'ions avec élution par un gradient de pH sont décrits dans Farnan et al-2009 et Rea et al-2011. Rea et al-2012 décrit également le principe de cette technologie, ainsi que comment choisir de manière appropriée la colonne, les
25 tampons et les paramètres d'opération pour séparer des isoformes ou variants de charge d'anticorps (voir section 8 pages 451-452). L'Exemple 1 décrit aussi la séparation des isoformes de charges d'une composition d'anticorps par chromatographie échangeuse de cations et élution par un gradient ascendant de pH.

30 Dans une autre variante de la chromatographie échangeuse d'ions, l'élution peut également être réalisée par la combinaison d'un gradient de force ionique et d'un gradient de pH (élution dite « hybride »), comme décrit dans Rea et al-2012 (voir section 9 page 453).

35 Dans encore une autre variante de la chromatographie échangeuse d'ions, appelée ici « chromatographie échangeuse d'ions de déplacement » et qui permet également de séparer les isoformes de charges d'une composition d'anticorps, une résine échangeuse d'ions (anions ou cations) est également utilisée comme phase fixe ou stationnaire, mais l'élution est réalisée non pas à l'aide d'un gradient de force

ionique et/ou de pH, mais à l'aide d'une molécule de déplacement, c'est-à-dire d'une molécule ayant une forte affinité pour la résine de chromatographie, qui va entrer en compétition pour la fixation sur la résine avec les molécules d'anticorps préalablement fixées sur la résine, et ainsi déplacer les molécules d'anticorps ayant une plus faible affinité pour la résine que la molécule de déplacement. Les molécules d'anticorps sont ainsi forcées à migrer le long de la colonne par une vague de molécule de déplacement. Comme celle-ci traverse la colonne, un nouvel équilibre s'installe, dans lequel les molécules d'anticorps entrent en compétition les unes avec les autres pour les sites de liaison à la résine restant disponibles. Au cours de ce processus d'équilibrage dynamique, les différents variants ou isoformes de charge d'anticorps sont séparés en fonction de leur affinité plus ou moins grande pour la résine échangeuse d'ions. Le principe de cette méthode de séparation chromatographique, ainsi que des résines, tampons et matériels nécessaires pour sa mise en œuvre afin de séparer les isoformes de charges d'une composition d'anticorps sont notamment décrits dans Khawli et al-2010, Zhang et al-2011, et McAtee et al-2012.

Dans ces différents modes d'élution de la chromatographie échangeuse d'ions, tout tampon d'élution (gradient de pH ou de force ionique) ou de déplacement approprié peut être utilisé, en fonction de la colonne choisie. Des exemples de résines et tampons associés sont décrits dans Farnan et al-2009, Khawli et al-2010, Gandhi et al-2011, Zhang et al-2011, Rea et al-2011 et McAtee et al-2012.

Une autre technique de chromatographie qui permet de séparer les isoformes de charge d'une composition d'anticorps est la chromatofocalisation. Dans cette technique, les protéines sont séparées en fonction de leur point isoélectrique (pI). Cette technique repose sur l'utilisation de l'association d'une résine (phase fixe ou stationnaire) particulière et d'un tampon amphotère particulier. Notamment, l'obtention d'un gradient linéaire de pH requiert une capacité tampon égale sur toute la gamme de pH utilisée pour la séparation, d'où la nécessité de tampons conçus spécifiquement pour cette application et de résines substituées avec des amines tampon chargées.

Le principe de la séparation est le suivant : une résine de chromatofocalisation est équilibrée avec un tampon de départ à un pH légèrement supérieur au pH le plus haut requis. Un tampon d'élution (ajusté au pH le plus bas requis) est passé à travers la colonne et commence à titrer les amines de la résine et des protéines. Au fur et à mesure que le tampon d'élution passe à travers la colonne, le pH est diminué et un gradient descendant et mouvant de pH est généré. L'échantillon est appliqué à la colonne après qu'un premier volume de tampons d'élution soit passé sur la colonne. Les protéines de l'échantillon sont titrées (ajustement du pH) dès

qu'elles sont introduites dans la colonne. Celle qui sont à un pH supérieur à leur pl sont chargées négativement et retenues près du sommet de la colonne (par liaison aux groupements amines chargés positivement). Les protéines qui sont à un pH inférieur à leur pl commencent à migrer le long de la colonne avec le flux de tampon et de se lieront pas à la colonne avant d'atteindre une zone où le pH est supérieur à leur pl. C'est de début du processus de séparation.

5 Au fur et à mesure que le pH continue à diminuer au sommet de la colonne (évolution du gradient de pH), toute protéine dont le pl est supérieur au nouveau pH devient chargée positivement, est repoussée par les groupements amines chargés positivement, et commence à migrer le long de la colonne avec le tampon d'élution, sa migration étant plus rapide que celle du gradient de pH. Au fur et à mesure que cette protéine migre le long de la colonne, le pH augmente. Lorsque la protéine atteint une zone où le pH est supérieur à son pl, elle redevient chargée négativement et se lie à nouveau à la colonne. Elle reste liée jusqu'à ce que le gradient de pH mouvant réduise le pH local en dessous de son pl, moment où elle redevient chargée positivement et recommence à migrer. Ce processus se répète jusqu'à ce que la protéine soit éluée de la colonne à un pH proche de son pl.

15 Le nom de cette technologie provient d'un effet de focalisation de la technique. En effet, dans un gradient descendant de pH, une protéine peut exister sous trois états de charge : positive, négative ou neutre. De plus, dans la chromatofocalisation, l'état de charge d'une protéine varie sans cesse au fur et à mesure que le gradient de pH se développe et que la protéine migre à travers les différentes zones de pH de la colonne. Les molécules à l'arrière d'une zone vont migrer plus rapidement que celles à l'avant de cette même zone, formant progressivement des bandes de plus en plus étroites de protéines, chaque bande correspondant à une ou plusieurs protéines de même pl.

25 Ainsi, en chromatofocalisation, les protéines ayant des pl différents migrent à différentes vitesses à travers la colonne au fur et à mesure que le gradient de pH se développe, se liant et se dissociant continuellement de la résine porteurs de groupements amines tampons chargés positivement, tout en étant progressivement focalisées en bandes étroites et finalement éluées. Les protéines avec le pl le plus élevé est éluée la première, alors que la protéine avec le pl le plus faible sera éluée la dernière.

30 La résine utilisée pour une séparation par chromatofocalisation est fondée sur une résine classique (polymère réticulé ou gel tel que décrit ci-dessus, de préférence sous forme de billes tel que décrit ci-dessus), notamment de type poly(styrène divinylbenzène) ou agarose réticulé, celle-ci étant caractérisée par le greffage de groupements amines tampons chargés positivement. Ces groupements amines

tampons chargés positivement sont notamment des groupements amines secondaires, tertiaires et/ou quaternaires. Des exemples de résines utiles en chromatofocalisation incluent les colonnes Mono™-P (poly(styrène divinylbenzène) réticulé greffé avec des groupements amines secondaires, tertiaires et/ou quaternaires), PBE 94 et PBE 118 (résines d'agarose à 6% réticulée greffée par des groupements amines secondaires, tertiaires et/ou quaternaires liés aux monosaccharides par des liaisons éther) commercialisées par GE Life Sciences ou GE Healthcare. Les colonnes Mono™-P et PBE 94 sont appropriées pour une séparation entre pH 9 et pH 4, tandis que la colonne PBE 118 est appropriée pour une séparation avec un gradient de pH commençant au-dessus de pH 9. Les colonnes Mono™-P et PBE 94, et notamment la colonne Mono™-P, sont préférées. Les tampons de départ utilisés peuvent reposer notamment sur une solution de diéthanolamine, de Tris, de triéthanolamine, de bis-Tris, de triéthylamine, d'éthanolamine, d'imidazole, d'histidine, ou de pipérazine à différents pH (ajout d'un acide type HCl, acide acétique, ou acide iminodoacétique). Les tampons amphotères d'éluion utilisés incluent notamment les tampons Polybuffer 74 (gamme de pH : 7-4, pour les colonnes Mono™-P et PBE 94), Polybuffer 96 (gamme de pH : 9-6, pour les colonnes Mono™-P et PBE 94), et Pharmalyte pH8-10.5 (gamme de pH : 11-8, pour la colonne PBE 118). Des instructions précises d'utilisation et de sélection de ces tampons sont disponibles auprès du fabricant de ces colonnes.

Encore une autre technique de chromatographie permettant de séparer les isoformes de charge d'une composition d'anticorps est la chromatographie d'interactions hydrophobes.

Ainsi, avantageusement, à l'étape b) du procédé permettant d'obtenir une composition d'anticorps monoclonal destinée à être utilisée en tant que médicament selon l'invention, le fractionnement de l'étape a) est réalisé par l'une des techniques de chromatographie suivantes :

- chromatographie échangeuse d'ions (anions ou cations) avec éluion par un gradient de force ionique (chromatographie échangeuse d'ions avec gradient de force ionique),
- chromatographie échangeuse d'ions (anions ou cations) avec éluion par un gradient (ascendant en cas d'échange de cations, descendant en cas d'échange d'anions) de pH (chromatographie échangeuse d'ions avec gradient de pH),

- chromatographie échangeuse d'ions (anions ou cations) avec élution par un gradient de force ionique et de pH (chromatographie échangeuse d'ions hybride),
- 5 • chromatographie échangeuse d'ions (anions ou cations) avec élution par une molécule de déplacement (chromatographie échangeuse d'ions de déplacement),
- chromatofocalisation, et
- chromatographie d'interactions hydrophobes.

Avantageusement, à l'étape b) du procédé permettant d'obtenir une composition
10 d'anticorps monoclonal destinée à être utilisée en tant que médicament selon l'invention, le fractionnement de l'étape a) est réalisé par l'une des techniques de chromatographie suivantes :

- chromatographie échangeuse d'ions (quel que soit le mode d'élution), en particulier la chromatographie échangeuse d'ions avec gradient de pH, et
- 15 • chromatofocalisation.

En particulier, les inventeurs ont pu séparer les isoformes ou variants de charge d'une composition d'anticorps monoclonal par deux techniques différentes, susceptibles d'être utilisées dans le cadre de l'invention :

- chromatofocalisation : colonne Mono™ P (GE Life Sciences) avec élution
20 par un gradient descendant de pH (de 9,5 à 8,0 en utilisant deux tampons : tampon A (diéthanolamine 25 mM), tampon B (polybuffer 96 + pharmalyte 8-10,5)) ;
- chromatographie échangeuse de cations (colonne SCX, MabPac, Dionex) avec élution par un gradient ascendant de pH (Tampon A : 20 mM
25 NaH₂PO₄, 60 mM NaCl (pH 6) ; Tampon B : 20 mM Na₂HPO₄, 60 mM NaCl (pH10), gradient : 10% à 60% de Tampon B en 60 minutes).

Le chromatogramme d'une composition d'anticorps obtenu par une technologie de chromatographie permettant de séparer les isoformes de charge comprend toujours
30 un pic majoritaire comprenant l'isoforme de charge majoritaire ainsi que d'autres isoformes proches de l'isoforme majoritaire (c'est-à-dire avec peu de modifications par rapport à l'isoforme majoritaire et donc un pI et une charge nette à un pH donné très proche de celui ou celle de l'isoforme majoritaire), entouré de pics minoritaires comprenant d'une part les isoformes dites « acides », dont le pI est inférieur par
35 rapport à l'isoforme majoritaire, et d'autre part les isoformes dites « basiques », dont le pI est supérieur par rapport à l'isoforme majoritaire (voir **Figures 1-2**).

En fonction de la technique de chromatographie utilisée, les différents isoformes apparaissent sur le chromatogramme et sont élués dans l'ordre suivant :

- 5 • Utilisation d'une chromatographie échangeuse de cations (résine chargée négativement), quel que soit le mode d'élution (élution par un gradient de force ionique, un gradient de pH, un gradient de Ph et de force ionique ou par une molécule de déplacement) : les isoformes acides (qui sont moins positivement chargées que l'isoforme majoritaire) sont élués les premiers, suivis de l'isoforme majoritaire, puis des isoformes basiques (qui sont davantage positivement chargées que l'isoforme majoritaire) (voir Figure 1 de Khawli et al-2010, Figure 3 de Rea et al-2012 ; Figure 1 de Farnan et al-2009 et Figure 1 de Rea et al-2011 ; Figure 1 de Zhang et al-2011 et Figure 8.10.2 de McAtee et al-2012 ; et **Figure 2** de la présente description) ;
- 10 • Utilisation d'une chromatographie échangeuse d'anions (résine chargée positivement), quel que soit le mode d'élution (élution par un gradient de force ionique, un gradient de pH, un gradient de Ph et de force ionique ou par une molécule de déplacement) : les isoformes basiques (qui sont moins négativement chargés que l'isoforme majoritaire) sont élués les premiers, suivis de l'isoforme majoritaire, puis des isoformes acides (qui sont davantage négativement chargées que l'isoforme majoritaire) ;
- 15 • Chromatofocalisation : les isoformes basiques sont élués les premiers, suivis de l'isoforme majoritaire, puis des isoformes acides (voir **Figure 1** de la présente description) ;
- 20

Les isoformes ou variants de charge d'un anticorps présents au sein d'une composition d'anticorps produite par un clone cellulaire, un animal transgénique non humain ou une plante transgénique, peuvent également être séparés par d'autres technologies que la chromatographie. Cependant, si ces technologies sont très utiles dans un but d'analyse ou de caractérisation des isoformes ou variants de charge, elles ne permettent pas de séparer ces isoformes avec un rendement acceptable et sont donc peu utilisées dans un but préparatif.

Parmi ces autres technologies, on peut notamment citer la focalisation isoélectrique (dite « IEF » pour « Isoelectric focusing », et également appelée électrofocalisation). Le principe de base de la focalisation isoélectrique (FIE) est de créer dans un gel (éventuellement inclus dans un capillaire) un gradient de pH dans lequel pourront se déplacer les protéines soumises à un champ électrique. Les protéines migreront dans ce champ électrique. Arrivées au pH correspondant à leur pI, elles s'immobiliseront puisque leur charge nette sera nulle. De cette façon, il est possible de séparer les protéines d'une préparation selon leur pI. On peut créer un tel gradient de pH avec des polyélectrolytes portant un certain nombre de groupes ionisables positivement ou négativement (amines, carboxyles ou sulfates) et

possédant un certain pouvoir tampon. Ces molécules sont appelées ampholytes. Si on soumet ces ampholytes à un champ électrique borné par une solution d'un acide fort à l'anode et par une solution d'une base forte à la cathode, ils migreront et se distribueront par ordre de pl. Leur capacité tampon aidera à maintenir autour d'elles
5 une petite zone de pH égal à leur pl. Une série d'ampholytes ayant donc chacun un pl couvrant une certaine gamme de pH créera donc un gradient continu de pH. Si on fait migrer une petite quantité de protéines dans ce système, après ou durant sa formation, elles migreront aussi et s'immobiliseront à leur pl.

Comme matrice inerte pour le gel, on peut utiliser de l'agarose, de l'acrylamide ou,
10 plus rarement du dextran, dans lequel se formera le gradient de pH. Un gel de polyacrylamide est le plus souvent utilisé. Puisque seul le pl doit influencer la migration, il faut utiliser des concentrations d'acrylamide dont la porosité ne ralentira pas les grosses protéines par rapport aux petites mais qui est suffisamment solide pour être aisément manipulable. Un gel de 5-6% fait généralement l'affaire.

15 Le tampon de l'anode est un acide fort, généralement de l'acide phosphorique. À la cathode, on place une base forte, souvent de la triéthanoamine.

Les ampholytes sont inclus dans le mélange de préparation du gel avant sa polymérisation. Ces molécules, qui sont des polyélectrolytes, se déplacent dans le champ électrique et se disposent les unes à la suite des autres dans l'ordre de leur
20 propre pl. Beaucoup de compagnies fabriquent un grand nombre de mélanges d'ampholytes couvrant des gammes très étroites ou très larges de pH: Ampholine® (notamment Ampholine® pH 6/8 et Ampholine® pH 7/9 commercialisés par Sigma Aldrich), Pharmalyte® (notamment Pharmalyte® pH 8/10,5 commercialisé notamment par Sigma Aldrich et GE Healthcare, Life Sciences), BioLite®
25 (notamment BioLite® pH 6/8, BioLite® pH 7/9 et BioLite® pH 8/10 commercialisé par Bio-Rad), Zoom® (notamment Zoom® pH 6/9 commercialisé par Life technologies/invitrogen), Servalyt™ (notamment Servalyt™ pH 6/8, Servalyt™ pH 6/9, Servalyt™ pH 7/9 commercialisés par Serva), SinuLyte™ (notamment SinuLyte™ pH 6/8, SinuLyte™ pH 6/9, SinuLyte™ pH 7/9, SinuLyte™ pH 8/10
30 commercialisés par Sinus), etc. Lorsqu'on applique une tension entre les deux électrodes, chaque ampholyte se déplacera jusqu'à son point isoélectrique et s'y immobilisera. On peut créer des gradients de diverses amplitudes de pH en combinant divers ampholytes. En particulier, pour l'analyse des isoformes de charge dans une composition d'anticorps, on peut réaliser des gradients avec de très
35 faibles intervalles (e.g. 0.1 unité de pH) entre chaque ampholyte, sur une petite gamme de pH centrée sur le pl moyen de l'anticorps et correspondant à la gamme de pl des différents isoformes (par exemple entre pH 6 et pH 8 ou entre pH 7 et pH 9), permettant une séparation très fine des différents isoformes de charge.

La composition d'anticorps à analyser peut être ajoutée après la polymérisation du gel ou directement dans le mélange avant la polymérisation. Comme les anticorps sont plus gros que les ampholytes, ils migreront beaucoup plus lentement et les ampholytes pourront donc se stabiliser à leur pI bien avant que les anticorps ne se
5 soient déplacés substantiellement.

La durée de la migration n'est pas critique. En effet, les anticorps ne risquent pas de sortir du gel puisqu'ils s'immobiliseront au point où ils auront atteint leur pI. Il convient seulement que la migration dure suffisamment longtemps pour que les ampholytes aient le temps de migrer correctement et que les anticorps aient le
10 temps d'atteindre leur pI. À 2 mA, on estime le temps requis à environ 1 heure.

Après migration, le gel peut être coloré pour analyser les différents isoformes de charge présents dans la composition d'anticorps. La coloration peut être réalisée par toute technique usuelle utilisée en électrophorèse classique. Il faut cependant éliminer les ampholytes du gel car elles peuvent se colorer. On fait donc
15 généralement précéder la coloration par trempage dans un bain d'acide trichloroacétique 5 ou 10% pour les faire diffuser hors du gel tout en fixant les anticorps sur place.

L'utilisation de marqueurs possédant un pI donné permet de déterminer assez précisément le pI des différents isoformes de charge.

20 Suite à la coloration, la proportion dans la composition analysée de chaque isoforme de charge séparé en IEF par rapport aux isoformes totaux peut être quantifiée à l'aide de logiciels d'analyse d'image, comme le logiciel Quantity One® par exemple, commercialisé par Bio-Rad.

Bien que très précise et sensible pour séparer les isoformes de charge présents dans une composition d'anticorps, la technologie de focalisation isoélectrique ne permet pas de récolter facilement les isoformes séparés et est donc généralement
25 utilisée plutôt à des fins d'analyse et de quantification qu'à des fins de séparation préparative des différents isoformes.

30 A l'étape c) du procédé, la composition d'intérêt selon l'invention, destinée à être utilisée en tant que médicament, est obtenue par regroupement d'une ou plusieurs fractions chromatographiques obtenues à l'étape b), correspondant au pic majoritaire du chromatogramme, la composition d'anticorps monoclonal ainsi obtenue étant enrichie dans ledit pic majoritaire, celui-ci représentant au moins
35 85%, avantageusement au moins 86%, au moins 87%, au moins 88%, au moins 89%, plus avantageusement au moins 90%, au moins 91%, au moins 92%, au moins 93%, au moins 94%, voire au moins 95%, au moins 96%, au moins 97%, au

moins 98%, au moins 98,5%, au moins 99%, ou au moins 99,5% du chromatogramme de la composition obtenue à l'étape c).

- 5 Avantageusement, dans une composition pour une utilisation en tant que médicament selon l'invention, au moins 95%, avantageusement au moins 96%, au moins 97%, au moins 98%, voire au moins 98,5%, au moins 99%, ou au moins 99,5% des chaînes lourdes des anticorps présents dans la composition ne comprennent pas de résidu lysine en C-terminal.
- 10 L'invention concerne également une composition d'anticorps monoclonal, dans laquelle au moins 95%, avantageusement au moins 96%, au moins 97%, au moins 98%, voire au moins 98,5%, au moins 99%, ou au moins 99,5% des chaînes lourdes des anticorps présents dans la composition ne comprennent pas de résidu lysine en C-terminal, pour son utilisation en tant que médicament. En effet, les isoformes
- 15 basiques des anticorps présents dans la composition possèdent au moins une chaîne lourde avec un résidu lysine en C-terminal. Une telle composition comprend donc uniquement l'isoforme majoritaire et les isoformes acides. Les isoformes basiques étant peu actives pour les fonctions effectrices via Fc γ RIII et via le complément (voir Exemples) et représentant avant purification environ 8 à 20 %
- 20 (mesurés par chromatographie), une telle composition est capable d'induire une plus forte ADCC via Fc γ RIII et une plus forte réponse CDC que la composition totale, avant exclusion des isoformes basiques. Une telle composition peut être obtenue par séparation chromatographique comme décrit ci-dessus, les fractions collectées correspondant toutefois dans ce cas à celles des isoformes acides et
- 25 majoritaire.

La composition d'anticorps susceptible d'être obtenue par le procédé décrit ci-dessus et destinée à être utilisée comme médicament, peut être utilisée dans toute

30 pathologie susceptible d'être traitée par des anticorps monoclonaux, en particulier lorsque la destruction de cellules cibles par ADCC ou par CDC est utile au traitement.

Il est aujourd'hui connu que l'ADCC est un mécanisme essentiel pour l'efficacité clinique d'un traitement d'immunothérapie passive à l'aide d'anticorps destiné au

35 traitement des cancers (Wallace et al-1994 ; Velders et al-1998 ; Cartron et al-2002 ; Ianello et al-2005 ; Weiner et al-2010), de la prévention de l'alloimmunisation chez les femmes enceintes Rhésus-négatives (Béliard et al-2008). De plus, la réponse ADCC est également connue pour jouer un rôle important dans la réponse anti-infectieuse contre les virus (Ahmad et al-1996, Miao et al-2009), les bactéries

(Albrecht et al-2007 ; Casadevall et al-2002) et les parasites (Zeitlin et al-2000). De plus, dans le cadre des maladies autoimmunes, de nouvelles thérapies visent à éliminer les cellules immunitaires responsables des attaques, telles que les lymphocytes B ou T par exemple, l'ADCC jouant alors un rôle très important
5 (Edwards et al-2006 ; Chan et al-2010).

La réponse CDC est également connue pour être importante dans différentes pathologies et notamment dans le traitement des cancers.

Ainsi, dans les compositions pour une utilisation en tant que médicament selon l'invention, l'anticorps est avantageusement dirigé contre un antigène non
10 ubiquitaire présent sur des cellules de donneur sain, un antigène d'une cellule cancéreuse, un antigène d'une cellule infectée par un agent pathogène, ou un antigène d'une cellule immunitaire.

En particulier, les modes de réalisation suivant sont préférés :

- 15 - l'anticorps est un anticorps anti-Rhésus D (notamment le Roledumab, le Atorolimumab ou le Morolimumab, en particulier le Roledumab) et la composition est destinée à la prévention de l'alloimmunisation chez les individus Rhésus-négatifs,
- l'anticorps est dirigé contre un antigène d'une cellule cancéreuse et la composition est destinée au traitement d'un cancer,
- 20 - l'anticorps est dirigé contre un antigène d'une cellule infectée par un agent pathogène et la composition est destinée au traitement d'une infection par ledit organisme pathogène,
- l'anticorps est dirigé contre un antigène d'une cellule immunitaire et la composition est destinée au traitement d'une maladie autoimmune.

25

Dans le cadre du traitement des cancers, les anticorps peuvent notamment être dirigés contre les antigènes suivants : CD20, Her2/neu, CD52, EGFR, EPCAM, CCR4, CTLA-4 (CD152), CD19, CD22, CD3, CD30, CD33, CD4, CD40, CD51 (Integrin alpha-V), CD80, CEA, FR-alpha, GD2, GD3, HLA-DR, IGF1R (CD221),
30 phosphatidylserine, SLAMF7 (CD319), TRAIL-R1, TRAIL-R2.

Plus précisément, des couples (antigène/cancer) spécifiques connus pour leur intérêt thérapeutique (anticorps de cette spécificité antigénique approuvé dans au moins un pays pour le traitement du cancer mentionné, ou essais cliniques en cours) sont indiqués dans le **Tableau 1** ci-dessous.

35

Tableau 1. Couples (antigène/cancer) spécifiques d'intérêt

Antigène	Exemple d'anticorps dirigé contre cet antigène	Cancer(s) susceptibles d'être traités avec un anticorps de cette spécificité antigénique
CD20	rituximab, ofatumumab, Ocrelizumab, Tositumomab, Veltuzumab, Ublituximab	Cancers hématologiques, notamment : lymphome non hodgkinien, lymphome de cellules B, leucémie lymphocytaire chronique, lymphome folliculaire,
Her2/neu	Trastuzumab, Pertuzumab	Cancers solides, notamment : cancer du sein, cancer du poumon non à petites cellules, cancer du pancréas, cancer de la prostate, cancer de l'ovaire
CD52	alemtuzumab	Cancers hématologiques, notamment : leucémie lymphocytaire chronique, leucémie myéloïde chronique, lymphome de cellules T cutané ou périphérique
EGFR	Cetuximab, panitumumab, Futuximab, Imgatuzumab, Matuzumab, Necitumumab, Nimotuzumab, Zalutumumab	Tumeurs solides, notamment : cancer colorectal, cancer de la tête et du cou, cancer du poumon, cancer de l'œsophage, cancer de l'estomac, gliome, astrocytome anaplastique, glioblastome
EPCAM	Edrecolomab, Adecatumumab, Solitomab,	Cancers solides, notamment : Cancer colorectal, cancer de la prostate, cancer du sein
CCR4	Mogamulizumab	Cancers hématologiques, notamment : Leucémie/lymphome de cellules T adulte
CTLA-4 (connu aussi sous la dénomination CD152)	Ipilimumab, Tremelimumab,	Tumeurs solides, notamment : mélanome, cancer de la prostate, cancer de la vessie

CD19	Blinatumomab (targets both CD19 and CD3)	Cancers hématologiques, notamment : Lymphome non hodgkinien, leucémie lymphoblastique aiguë, cancer du poumon, cancer gastrointestinal
CD22	Epratuzumab	Cancers hématologiques, notamment : cancers des cellules B
CD3	Otelixizumab, Teplizumab, Visilizumab	Cancers hématologiques, notamment : myélome multiple
CD30	Iratumumab	Cancers hématologiques, notamment : lymphome non hodgkinien
CD33	Lintuzumab	Cancers hématologiques, notamment : leucémie myéloïde aiguë, syndromes myélodysplastiques
CD4	Cedelizumab, Clenoliximab, Priliximab, Zanolimumab	Mélanome, lymphome de cellules T cutané ou périphérique
CD40	Dacetuzumab, Lucatumumab, Teneliximab	Cancers hématologiques, notamment : lymphome non hodgkinien, lymphome de Hodgkin, myélome multiple
CD51 (Integrin alpha-V)	Intetumumab	Tumeurs solides
CD80	Galiximab	Cancers hématologiques, notamment : lymphome de cellules B
CEA	Labetuzumab	Tumeurs solides, notamment : cancer colorectal
FR-alpha	Farletuzumab	Cancer de l'ovaire
Ganglioside GD2	3F8, TRBS07	Neuroblastome, mélanome
Ganglioside GD3	Ecromeximab, Mitumomab	Mélanome, cancer du poumon à petites cellules
HLA-DR	Apolizumab	Cancers hématologiques
IGF1R (CD221)	Cixutumumab, Figitumumab, Robatumumab, Ganitumab	Tumeurs solides, notamment : cancer du poumon non à petites cellules, carcinome adénocortical, cancer du pancréas

phosphatidyl serine	Bavituximab	Tumeurs solides, notamment : cancer du sein, cancer du poumon non à petites cellules
SLAMF7 (CD319)	Elotuzumab	Myélome multiple
TRAIL-R1	Mapatumumab	Tumeurs solides, notamment : cancer du poumon non à petites cellules, cancer colorectal ; lymphome non hodgkinien
TRAIL-R2	Conatumumab, Lexatumumab, Tigatuzumab	Tumeurs solides, notamment : cancer du sein, cancer du pancréas, cancer colorectal, cancer du poumon non à petites cellules, cancer de l'ovaire

Dans le cadre du traitement des infections par des organismes pathogènes, les anticorps peuvent notamment être dirigés contre les antigènes suivants : antigènes de *Clostridium difficile*, antigènes de *Staphylococcus aureus* (notamment ClfA et acide lipotheicoïque), antigènes du cytomégalovirus (notamment la glycoprotéine B),
5 antigènes d'*Escherichia coli* (notamment toxine Shiga-like, sous unité IIB), antigènes du virus respiratoire syncytial (Protéine F notamment), antigènes du virus de l'hépatite B, antigènes du virus Influenza A (Hémagglutinine notamment), antigènes de *Pseudomonas aeruginosa* sérotype IATS O11, antigènes du virus de la rage
10 (Glycoprotéine notamment), phosphatidylserine

Plus précisément, des couples (antigène/maladie infectieuse) spécifiques connus pour leur intérêt thérapeutique (anticorps de cette spécificité antigénique approuvé dans au moins un pays pour le traitement de la maladie infectieuse mentionnée, ou essais cliniques en cours) sont indiqués dans le **Tableau 2** ci-dessous.

15

Tableau 2. Couples (antigène/maladie infectieuse) spécifiques d'intérêt

Antigène	Exemple d'anticorps dirigé contre cet antigène	Maladie(s) infectieuse(s) susceptible(s) d'être traitée(s) avec un anticorps de cette spécificité antigénique
Antigène de <i>Clostridium difficile</i>	Actoxumab, Bezlotoxumab	<i>Clostridium difficile</i> infection

Antigène ClfA de <i>Staphylococcus aureus</i>	Tefibazumab	<i>Staphylococcus aureus</i> infection
Antigène du cytomégalovirus	Sevirumab	Infection par le cytomégalovirus
glycoprotéine B du cytomégalovirus	Regavirumab	Infection par le cytomégalovirus
toxine Shiga-like, sous unité IIB d' <i>Escherichia coli</i>	Urtoxazumab	Infection par <i>Escherichia coli</i> , serotype O121
Protéine F du virus respiratoire syncytial	Palivizumab, Motavizumab	Infection par le virus respiratoire syncytial
Antigène de surface du virus de l'hépatite B	Exbivirumab, Libivirumab	Infection par le virus de l'hépatite B
Antigène du virus de l'hépatite B	Tuvirumab	Infection par le virus de l'hépatite B
Hémagglutinine du virus Influenza A	CR6261	Grippe, notamment grippe espagnole et H5N1
Acide lipotheicoïque de <i>Staphylococcus aureus</i>	Pagibaximab	<i>Staphylococcus aureus</i> infection, choc septique par <i>Staphylococcus aureus</i>
phosphatidylserine	Bavituximab	Infection par les virus de l'hépatite C, influenza A et B, VIH 1 et 2, rougeole, virus syncytial respiratoire, virus pichinde
Antigène de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sérotype IATS O11	Panobacumab	Infection par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Glycoprotéine du virus de la rage	Foravirumab, Rafivirumab	Infection par le virus de la rage

Dans le cadre du traitement des maladies autoimmunes, les anticorps peuvent notamment être dirigés contre les antigènes suivants : CD20, CD52, CD25, CD2, CD22, CD3, et CD4.

Plus précisément, des couples (antigène/maladie autoimmune) spécifiques connus pour leur intérêt thérapeutique (anticorps de cette spécificité antigénique approuvé dans au moins un pays pour le traitement de la maladie autoimmune mentionnée, ou essais cliniques en cours) sont indiqués dans le **Tableau 3** ci-dessous.

5

Tableau 3. Couples (antigène/maladie autoimmune) spécifiques d'intérêt

Antigène	Exemple d'anticorps dirigé contre cet antigène	Maladie(s) autoimmune(s) susceptible(s) d'être traitée(s) avec un anticorps de cette spécificité antigénique
CD20	rituximab, ofatumumab, Ocrelizumab, Tositumomab, Veltuzumab, Ublituximab	Polyarthrite rhumatoïde, purpura thrombocytopénique, lupus érythémateux, sclérose en plaques
CD52	alemtuzumab	Sclérose en plaques
CD25	Daclizumab, Basiliximab, Inolimomab	Uvéïte, sclérose en plaques, psoriasis, diabète de type 1, colite ulcéreuse
CD2	Siplizumab	psoriasis
CD22	Epratuzumab	Lupus érythémateux
CD3	Otelixizumab, Teplizumab, Visilizumab	Diabète de type 1, colite ulcéreuse, maladie de Crohn
CD4	Cedelizumab, Clenoliximab, Priliximab, Zanolimumab	Polyarthrite rhumatoïde, maladie de Crohn, sclérose en plaques, psoriasis

Les compositions d'anticorps destinées à une utilisation en tant que médicament selon l'invention sont notamment destinées aux thérapies impliquant une réponse ADCC, ce qui inclut de nombreux cas de figures comme expliqué en détail ci-dessus. Il est donc avantageux que ces anticorps aient également été optimisés par d'autres moyens pour induire une réponse ADCC *in vivo* via le récepteur FcγRIII la plus forte possible. Ainsi, dans un mode de réalisation avantageux, dans une composition pour une utilisation en tant que médicament selon l'invention, l'anticorps comprend une modification du fragment Fc augmentant sa liaison au récepteur FcγRIII et ses propriétés effectrices via le récepteur FcγRIII.

15

Deux moyens principaux ont pour le moment été décrits pour optimiser une activité ADCC via le récepteur FcγRIII :

- L'insertion d'au moins une mutation au niveau de certains résidus acides aminés du fragment Fc, comme décrit notamment dans WO00/42072, Shields et al-2001, Lazar et al-2006, WO2004/029207, WO/2004063351, WO2004/074455.
- 5 - L'optimisation de la nature des *N*-glycannes attachés au résidu Asn297 de chaque chaîne lourde dans le fragment Fc.

Ainsi, un mode de réalisation avantageux, une composition pour une utilisation en tant que médicament selon l'invention comprend un anticorps monoclonal dont la séquence a été modifiée au niveau d'au moins un résidu d'acides aminés du fragment Fc pour augmenter la liaison au récepteur Fc γ RIII, comme décrit dans
10 WO00/42072, Shields et al-2001, Lazar et al-2006, WO2004/029207, WO/2004063351, WO2004/074455.

En particulier, des mutations aux positions suivantes du Fc ont été décrites comme permettant d'augmenter l'affinité pour le récepteur Fc γ RIII et la capacité à induire
15 une ADCC via ce récepteur : 219, 222, 224, 239, 247, 256, 267, 270, 283, 280, 286, 290, 294, 295, 296, 298, 300, 320, 326, 330, 332, 333, 334, 335, 339, 360, 377, 396.

Plus particulièrement, les substitutions suivantes ont été décrites comme permettant d'augmenter l'affinité pour le récepteur Fc γ RIII et la capacité à induire une ADCC via
20 ce récepteur : S219Y ; K222N; H224L; L234E, L234Y, L234V; L235D, L235S, L235Y, L235I; S239D, S239T ; V240I, V240M; P247L ; T256A, T256N ; V264I, V264T; V266I ; S267A ; D270E ; D280A, D280K, D280H, D280N, D280T, D280Q, D280Y ; V282M; E283Q; N286S; K290A, K290Q, K290S, K290E, K290G, K290D, K290P, K290N, K290T, K290S, K290V, K290T, K290Y; E294N; Q295K; Y296W;
25 S298A, S298N, S298V, S298D, S298E; Y300I, Y300L; K320M, K320Q, K320E; N325T; K326S, K326N, K326Q, K326D, K326E; A330K, A330L, A330Y, A330I; I332E, I332D; E333A, E333Q, E333D; K334A, K334N, K334Q, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334H, K334V, K334L, K334I; T335E, T335K ; A339T ; K360A ; F372Y ; I377F ; V379M ; P396H, P396L ; D401V.

30 Des combinaisons de mutations intéressantes incluent : E333A/K334A, T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K334A, S298A/E333A/K334A, S267A/D280A (WO00/42072), S239D/I332E, S239D/I332E/A330L (Lazar et al-2006), V264I/I332E, S298A/I332E, S239E/I332E, S239Q/I332E, S239D/I332D, S239D/I332E, S239D/I332N, S239D/I332Q, S239E/I332D, S239E/I332N, S239N/I332E,
35 S239Q/I332D, A330Y/I332E, V264I/A330Y/I332E, A330L/I332E, V264I/A330L/I332E, S239E/V264I/I332E, S239E/V264I/A330Y/I332E, S239D/A330Y/I332E, S239N/A330Y/I332E, S239D/A330L/I332E,

S239N/A330L/I332E, V264I/S298A/I332E, S239D/S298A/I332E,
S239N/S298A/I332E, S239D/V264I/I332E (WO2004/029207).

Alternativement ou en sus, une composition d'anticorps monoclonal pour une utilisation en tant que médicament selon l'invention comprend une faible teneur en
5 fucose. Par « teneur en fucose », on entend le pourcentage de formes fucosylées au sein des N-glycannes attachés au résidu Asn297 du fragment Fc de chaque chaîne lourde de chaque anticorps. Par « faible teneur en fucose », on entend une teneur en fucose inférieure ou égale à 65%. En effet, il est aujourd'hui connu que la
10 teneur en fucose d'une composition d'anticorps joue un rôle crucial dans la capacité de cette composition à induire une forte réponse ADCC via le récepteur Fc γ RIII. Avantagusement, la teneur en fucose est inférieure ou égale à 65%, de préférence inférieure ou égale à 60%, à 55% ou à 50%, voire inférieure ou égale à 45%, à 40%, à 35%, à 30%, à 25% ou à 20%. Cependant, il n'est pas nécessaire que la teneur
15 en fucose soit nulle, et elle peut par exemple être supérieure ou égale à 5%, à 10%, à 15% ou à 20%. La teneur en fucose peut par exemple être comprise entre 5 et 65%, entre 5 et 60%, entre 5 et 55%, entre 5 et 50%, entre 5 et 45%, entre 5 et 40%, entre 5 et 35%, entre 5 et 30%, entre 5 et 25%, entre 5 et 20%, entre 10 et 65%, entre 10 et 60%, entre 10 et 55%, entre 10 et 50%, entre 10 et 45%, entre 10 et 40%, entre 10 et 35%, entre 10 et 30%, entre 10 et 25%, entre 10 et 20%, entre
20 15 et 65%, entre 15 et 60%, entre 15 et 55%, entre 15 et 50%, entre 15 et 45%, entre 15 et 40%, entre 15 et 35%, entre 15 et 30%, entre 15 et 25%, entre 15 et 20%, entre 20 et 65%, entre 20 et 60%, entre 20 et 55%, entre 20 et 50%, entre 20 et 45%, entre 20 et 40%, entre 20 et 35%, entre 20 et 30%, entre 20 et 25%.

La composition d'anticorps peut par ailleurs posséder différents types de
25 glycosylation (N-glycannes de type oligomannose ou complexes biantennés, proportion variable de résidus N-acétylglucosamine (GlcNAc) intercalaires ou de résidus galactose dans le cas des N-glycannes de type complexes biantennés), à condition de posséder un faible teneur en fucose. Ainsi, des N-glycannes de type oligomannose peuvent être obtenus par culture en présence de différents inhibiteurs
30 de glycosylation, tels que les inhibiteurs de α 1,2-mannosidase I (comme la *Deoxymannojirimycine* ou « DMM ») ou de l' α -glucosidase (comme la castanospermine ou « Cs »); ou bien par production de l'anticorps dans la lignée CHO Lec 1. La production dans le lait de chèvres transgéniques conduit également à l'obtention d'anticorps dont le N-glycane majoritaire est de type oligomannose,
35 avec comme formes minoritaires des formes complexes biantennées fucosylées avec un ou deux galactoses, sans GlcNAc intercalaire et sans sialylation (G1F ou G2F) (voir WO2007048077A2). Des N-glycannes de type complexe biantenné peuvent être obtenus dans la plupart des cellules de mammifères, mais également

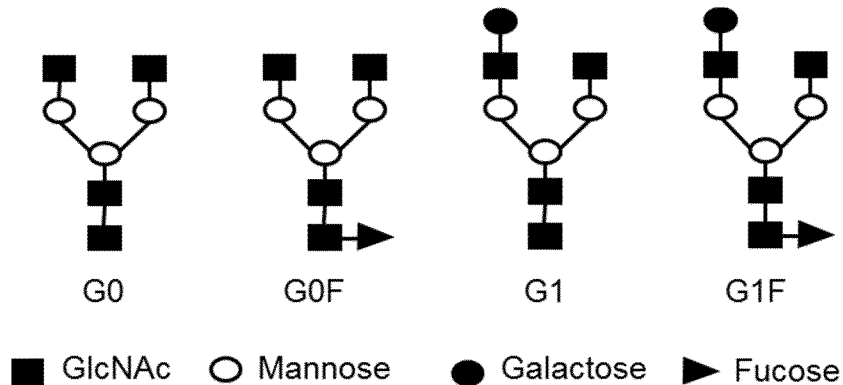
dans des bactéries, levures ou plantes dont la machinerie de glycosylation a été modifiée. Pour limiter la teneur en fucose, des lignées possédant naturellement une faible activité de l'enzyme FUT8 (1,6-fucosyltransférase) responsable de l'ajout du fucose sur le GlcNAc lié au fragment Fc ; telles que la lignée YB2/0, la lignée de cellule embryonnaire de canard EB66®, ou les lignées d'hépatome de rat rat H4-II-E (DSM ACC3129), H4-II-Es (DSM ACC3130) ; peuvent être utilisées. Des lignées mutantes pour d'autres gènes et dont la sous-expression ou la surexpression conduit à une faible teneur en fucose peuvent également être utilisées, comme la lignée CHO Lec13, un mutant de la lignée CHO ayant une synthèse diminuée du GDP-fucose. Il est également possible de sélectionner une lignée d'intérêt et de diminuer ou abolir (notamment par utilisation d'ARN interférents ou par mutation ou délétion du gène exprimant la protéine d'intérêt) l'expression d'une protéine impliquée dans la voie de fucosylation des N-glycannes (notamment FUT8, voir Yamane-Ohnuki et al-2004 ; mais également GMD, un gène impliqué dans le transport du GDP-fucose, voir Kanda et al-2007). Une autre alternative consiste à sélectionner une lignée d'intérêt et à surexprimer une protéine interférant d'une façon ou d'une autre avec la fucosylation des N-glycannes, comme la protéine GnTIII ($\beta(1,4)$ -N-acétylglucosaminetransférase III). En particulier, des anticorps possédant des N-glycannes faiblement fucosylés ont été notamment obtenus par :

- Production dans YB2/0 (voir EP1176195A1, WO01/77181, Shinkawa et al-2003) CHO Lec13 (voir Shields et al-2002), EB66® (Olivier et al-2010), ou les lignées d'hépatome de rat rat H4-II-E (DSM ACC3129), H4-II-Es (DSM ACC3130) (voir WO2012/041768).
- Production dans une lignée CHO sauvage en présence de petits ARNs interférents dirigés contre FUT8 (Mori et al-2004, Suzuki et al-2007, Cardarelli et al-2009, Cardarelli et al-2010, Herbst et al-2010), ou GMD (gène codant pour le transporteur du GDP-fucose dans le Golgi, voir Imai-Nishiya et al-2007)
- Production dans une lignée CHO dont les deux allèles du gène FUT8 codant pour la 1,6-fucosyltransférase ont été délétés (Yamane-Ohnuki et al-2004), ou dont les deux allèles du gène GMD codant pour le transporteur du GDP-fucose dans le Golgi ont été délétés (Kanda et al-2007),
- Production dans une lignée CHO dans laquelle le gène codant pour l'enzyme GnTIII ($\beta(1,4)$ -N-acétylglucosaminetransférase III) a été surexprimé par transgénèse (Umana et al-1999). Outre une faible fucosylation, les N-glycannes obtenus sont caractérisés par une forte teneur en GlcNAc intercalaire.

- Production dans des plantes (*N. benthamiana*) transgéniques, avec une forte diminution des teneurs en résidus β 1,2-xylose et α 1,3-fucose grâce à l'utilisation de petits ARNs interférents (Forthal et al-2010).

Les N-glycannes de type oligomannose ont une demi-vie réduite *in vivo* par rapport aux N-glycannes de type complexe biantenné. Par conséquent, avantageusement, les anticorps présents dans la composition possèdent sur leurs sites de N-glycosylation du fragment Fc des structures glycaniques de type complexe biantenné, avec une faible teneur en fucose, comme défini ci-dessus.

En particulier, la composition d'anticorps monoclonal peut posséder une teneur en formes G0+G1+G0F+G1F supérieure à 60% et une faible teneur en fucose, telle que définie ci-dessus. Elle peut également posséder teneur en formes G0+G1+G0F+G1F supérieure à 65% et une faible teneur en fucose, telle que définie ci-dessus. Elle peut également posséder teneur en formes G0+G1+G0F+G1F supérieure à 70% et une faible teneur en fucose, telle que définie ci-dessus. Elle peut également posséder teneur en formes G0+G1+G0F+G1F supérieure à 75% et une faible teneur en fucose, telle que définie ci-dessus. Elle peut également posséder teneur en formes G0+G1+G0F+G1F supérieure à 80% et une faible teneur en fucose, telle que définie ci-dessus. Elle peut également posséder teneur en formes G0+G1+G0F+G1F supérieure à 60%, à 65%, à 70%, à 75% ou à 80% et une teneur en formes G0F+G1F inférieure à 50%. Les formes G0, G1, G0F et G1F sont telles que définies ci-dessous :



25

De telles compositions d'anticorps peuvent notamment être obtenues par production dans YB2/0, dans CHO Lec13, dans des lignées CHO sauvages cultivées en présence de petits ARNs interférents dirigés contre FUT8 ou GMD, dans des lignées CHO dont les deux allèles du gène FUT8 codant pour la 1,6-

fucosyltransférase ou les deux allèles du gène GMD codant pour le transporteur du GDP-fucose dans le Golgi ont été délétés.

5 Les compositions d'anticorps destinées à une utilisation en tant que médicament selon l'invention sont également destinées aux thérapies impliquant une réponse CDC. Il peut donc également être avantageux, en sus ou alternativement à des modifications augmentant l'activité via Fc γ RIII que ces anticorps aient également été optimisés par d'autres moyens pour induire une réponse CDC *in vivo* via la protéine C1q la plus forte possible. Ainsi, dans un mode de réalisation avantageux, dans une
10 composition pour une utilisation en tant que médicament selon l'invention, l'anticorps comprend une modification du fragment Fc augmentant sa liaison à la protéine C1q et ses propriétés effectrices via le complément.

De telles mutations sont notamment décrites dans les documents suivants : WO2004074455A2, Idusogie et al-2001, Dall'Acqua et al-2006(b), et Moore et al-
15 2010.

La présente invention concerne également l'utilisation d'une étape de fractionnement par chromatographie pour augmenter la capacité d'une composition d'anticorps monoclonal dirigé contre un anticorps donné à induire la cytotoxicité
20 cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC) de cellules cibles exprimant ledit antigène par les cellules effectrices du système immunitaire exprimant le récepteur Fc γ RIII (CD16).

La composition ainsi obtenue possède une capacité améliorée à induire l'ADCC de cellules cibles exprimant l'antigène d'intérêt par les cellules effectrices du système
25 immunitaire exprimant le récepteur Fc γ RIII (CD16), et notamment par les cellules tueuses naturelles (ou cellules NK pour « Natural killer cells »). De préférence, le rapport R des taux ADCC obtenus avec la composition enrichie en isoformes du pic majoritaire et avec la composition avant fractionnement, défini par la formule suivante :

$$R = \frac{\text{taux ADCC obtenu avec la composition enrichie en isoformes du pic majoritaire}}{\text{taux ADCC obtenu avec la composition avant fractionnement}}$$

30

est d'au moins 1,15 (correspondant à une augmentation du taux ADCC d'au moins 15%); avantageusement au moins 1,16; au moins 1,17; au moins 1,18; au moins 1,19; plus avantageusement au moins 1,20; au moins 1,25; au moins 1,30; au moins 1,35; au moins 1,40; au moins 1,45; voire au moins 1,50 (correspondant à
35 une augmentation du taux ADCC d'au moins 50%).

La présente invention concerne également l'utilisation d'une étape de fractionnement par chromatographie pour augmenter la capacité d'une composition d'anticorps monoclonal dirigé contre un anticorps donné à induire la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) de cellules cibles exprimant ledit antigène par le complément.

La composition ainsi obtenue possède une capacité améliorée à induire la lyse par le complément de cellules cibles exprimant l'antigène d'intérêt. De préférence, le rapport R des taux CDC obtenus avec la composition enrichie en isoformes du pic majoritaire et avec la composition avant fractionnement, défini par la formule suivante :

$$R = \frac{\text{taux CDC obtenu avec la composition enrichie en isoformes du pic majoritaire}}{\text{taux CDC obtenu avec la composition avant fractionnement}}$$

est d'au moins 1,15 (correspondant à une augmentation du taux CDC d'au moins 15%); avantageusement au moins 1,16; au moins 1,17; au moins 1,18; au moins 1,19; plus avantageusement au moins 1,20; au moins 1,25; au moins 1,30; au moins 1,35; au moins 1,40; au moins 1,45; voire au moins 1,50 (correspondant à une augmentation du taux CDC d'au moins 50%).

Dans les deux utilisations ci-dessus, l'étape de fractionnement par chromatographie peut être réalisée de toute manière décrite ci-dessus pour obtenir les compositions d'anticorps enrichies en isoforme majoritaire selon l'invention pour leur utilisation en tant que médicament. En particulier, le fractionnement peut être réalisé par l'une des techniques de chromatographie suivantes :

- chromatographie échangeuse d'ions, quel que soit le mode d'élution (gradient de force ionique, gradient de pH, gradient de pH et de force ionique, molécule de déplacement);
- chromatofocalisation;
- chromatographie d'interactions hydrophobes.

La composition d'anticorps monoclonal pour laquelle une telle étape de fractionnement par chromatographie est réalisée dans le but d'augmenter les capacités d'ADCC ou de réponse CDC via les cellules effectrices exprimant CD16 peut être toute composition d'anticorps monoclonal décrite ci-dessus. En particulier, l'anticorps monoclonal présent dans la composition peut être humain, humanisé ou chimérique.

Il peut également être dirigé contre tout type d'antigène et notamment ceux décrits ci-dessus. En particulier, lorsque les cellules cibles sont des cellules cancéreuses, l'anticorps peut être dirigé contre un antigène de cellule cancéreuse, et notamment

- l'un des antigènes décrits ci-dessus dans le cadre du traitement des cancers. Lorsque les cellules cibles sont des cellules infectées par un agent pathogène, l'anticorps peut être dirigé contre un antigène des cellules infectées, et notamment contre l'un des antigènes décrits ci-dessus dans le cadre du traitement des maladies infectieuses. Lorsque les cellules cibles sont des cellules immunitaires impliquées dans le développement d'une maladie autoimmune, l'anticorps peut être dirigé contre un antigène de ces cellules immunitaires, et notamment contre l'un des antigènes décrits ci-dessus dans le cadre du traitement des maladies autoimmunes.
- 5
- 10 L'étape de fractionnement par chromatographie (étape a)) est de préférence suivie d'une étape de regroupement des fractions chromatographiques obtenues correspondant au pic majoritaire du chromatogramme (étape b)), la composition d'anticorps monoclonal ainsi obtenue étant enrichie dans ledit pic majoritaire, celui-ci représentant au moins 85% du chromatogramme de la composition obtenue à
- 15 l'étape b) (après fractionnement et regroupement des fractions chromatographiques d'intérêt).

Les exemples suivants correspondent à des illustrations de la présente invention.

Exemples

- 20 ***Exemple 1. Préparation de fractions purifiées des isoformes de charge d'une composition d'anticorps anti-CD20, caractérisation des isoformes et de leurs propriétés effectrices***

Matériels et méthodes

Composition d'anticorps anti-CD20

- 25 Toutes les séparations et analyses ont été effectuées sur un lot de composition d'anticorps anti-CD20 produit par un clone YB2/0.

Séparation des isoformes de charge par chromatofocalisation

Trois séparations préparatives des isoformes de charge d'une même composition d'anticorps ont été réalisées par chromatofocalisation.

- 30 Une résine échangeuse d'anions Mono P 5/200 GL a été utilisée. 20 mg de protéine dessalée ont été injectés à chaque séparation. L'élution a été réalisée à l'aide d'un gradient descendant de pH (pH 9,5 à 8,0), en utilisant les deux tampons suivants :
- Tampon A : diéthanolamine 25 mM,

- Tampon B : polybuffer 96 + pharmalyte 8-10,5.

Les éluats des séparations ont été collectés en fractions de 2mL. Les fractions d'intérêt sont les fractions 33 à 50.

Les fractions des 3 séparations ont été concentrées pour analyse.

- 5 La séparation 1 (S1) a subi une concentration particulière pour que les fractions puissent être rendues stériles par filtration :
- Concentration des fractions sur Amicon Ultra 10kDa pour obtenir un volume de 1 mL
 - Filtration stérilisante
- 10 - Prélèvement d'un aliquot pour mesure de la concentration et d'un aliquot pour mesure d'activité

Séparation des isoformes de charge par chromatographie échangeuse de cations (CEX)

- 15 Onze séparations des isoformes de charge ont été réalisées par chromatographie échangeuse de cations avec élution par un gradient ascendant de pH (CEX).

Une résine échangeuse de cations SCX (MabPac SCX 10 4x250 mm, Dionex) a été utilisée à 30°C. L'élution a été réalisée à l'aide d'un gradient ascendant de pH (pH 6 à 10), en utilisant les deux tampons suivants :

- Tampon A : 20 mM NaH₂PO₄, 60 mM NaCl (pH 6),
- 20 - Tampon B : 20 mM Na₂HPO₄, 60 mM NaCl (pH10).

Le gradient a été obtenu de la façon suivante : 10% à 60% de tampon B en 60 minutes.

Les éluats des séparations ont été collectés en fractions. Les fractions d'intérêt sont les fractions 1 à 20.

25 Analyse de la liaison au récepteur CD16 par BIACORE

- Une méthode a été développée pour mesurer la capacité d'une composition d'anticorps à se lier au récepteur CD16a en utilisant la technologie SPR (« Surface plasmon resonance ») sur un système Biacore T100 (GEHealthcare). Un récepteur CD16a soluble a été immobilisé sur la puce de détection en utilisant un couplage amine. Une cellule de flux est utilisée pour l'anticorps, l'autre cellule de flux est laissée libre pour soustraire le bruit de fond. Les anticorps sont injectés à
- 30 trois concentrations et les paramètres cinétiques sont estimés en réalisant pour chaque concentration un rapport de liaison à la fois à la phase d'association et à la phase de dissociation. Le signal SPR, exprimé en unités de résonance (RU),
- 35 représente l'association et la dissociation de l'anticorps au récepteur.

Activation de cellules effectrices via CD16 (Test Jurkat CD16)

La capacité des différentes fractions séparées par chromatofocalisation et par chromatographie échangeuse de cations (CEX), comprenant différentes isoformes de charge, à induire une réponse de cellules effectrices via le récepteur CD16 (Fc γ RIII) a été testée.

5

Le test utilisé est le suivant :

Les anticorps sont incubés avec des cellules WIL2-S (cellules cibles CD20 positives) et des cellules Jurkat CD16 (cellules effectrices) (génotype CD16FF). La quantité de cytokines (IL2) sécrétée par les cellules Jurkat CD16 a été mesurée par ELISA.

10

Plus précisément, en plaque de 96 puits, on mélange :

15

- Anticorps : 50 μ l de dilutions allant de 0,156 à 10 ng/ml en IMDM 5% SVF
- PMA 50 μ l d'une dilution à 40ng/ml en IMDM 5% SVF (soit 2ng PMA / 50 μ l)
- Cellules WIL2-S : 50 μ l à 6x10⁵/ml en IMDM 5% SVF (soit 30x10³ cellules/50 μ l)
- Jurkat CD16. 50 μ l à 10x10⁶/ml en IMDM 5% SVF (soit 500x10³ cellules/50 μ l)

Deux contrôles sont utilisés : contrôle négatif sans cellules cibles et contrôle positif activité maximale :

20

Contrôle négatif sans cellules : on ajout par puits :

- 50 μ l de cellules Jurkat CD16 à 10x10⁶ cellules/ml (soit 500x10³ cellules/50 μ l)
- 50 μ l de PMA à 40 ng/ml (soit 2ng PMA / 50 μ l)
- 50 μ l d'anticorps à la concentration la plus forte
- 50 μ l de milieu IMDM + 5 % SVF

25

Contrôle positif activité maximale : on ajout par puits :

- 50 μ l de cellules Jurkat CD16 à 10x10⁶ cellules/ml (soit 500x 10³ cellules / 50 μ l)
- 50 μ l de PMA à 40 ng/ml (soit 2ng PMA / 50 μ l)
- 50 μ l de Ionomycine à 5 μ g/ml
- 50 μ l de milieu IMDM + 5 % SVF

30

Agiter doucement et incuber une nuit à 37°C +/- 0.5°C

Décanner les cellules 1 minute à 125 g

Transférer 160 μ l de surnageant dans une plaque 96 puits fonds ronds

35

Décanner de nouveau les cellules 1 minute à 125 g

Doser l'IL-2 dans le surnageant. Lecture à 450nm.

L'activité CD16 (sécrétion d'IL-2) de chaque échantillon est exprimée en pourcentage de l'activité CD16 d'un échantillon de référence.

Cytotoxicité dépendante du complément (CDC)

Les cellules cibles Wil2-S sont cultivées dans un milieu d'IMDM avec 10 % de SVF décomplémenté (milieu I10). Elles sont repiquées deux fois par semaine dans 100ml de milieux à $0.2 \cdot 10^6$ cellules/ml dans une flasque F175. Le test s'effectue sur des cellules repiquées depuis 24 à 72 heures, et reprises à $1 \cdot 10^6$ cellules/ml dans un milieu IMDM+5%SVF décomplémenté (milieu I5).

Le sérum humain (sérum humain AB obtenu par coagulation d'un sang total) est décongelé le jour où il est utilisé. La décongélation est réalisée à + 4° C. Après décongélation le sérum est dilué au ½ dans du milieu I5.

Le CellTiter-Blue® (Proméga) est stocké à - 20° C, il est laissé décongelé à température ambiante avant utilisation.

La concentration des anticorps à étudier est ajustée à 1µg/ml dans du milieu I5.

15 Dans une plaque à 96 puits fonds U, ajouter :

- 50 µl de cellules cibles (Wil2S à $1 \cdot 10^6$ cellules/ml)
- 50 µl d'anticorps à tester
- 50 µl de sérum humain dilué ½.

Les cellules sont déposées directement dans la plaque après ajustement à $1 \cdot 10^6$ C/ml et mis à 37° C.

On incube pendant 5 minutes les cellules et l'échantillon sous agitation à 37° C avant de déposer le sérum.

Deux témoins sont réalisés : sans cellules (C-) et sans anticorps (AC-). L'élément manquant est remplacé par du milieu I5.

25 On incube à 37° C pendant 2 heures sous agitation. On ajoute alors 30 µl de CellTiter-Blue® dans chaque puits, on homogénéise par pipetage inverse au moment de l'ajout et on incube à 37° C pendant 3 heures et 30 minutes sous agitation.

Au terme de l'incubation la lecture peut être différée le lendemain en stoppant et stabilisant la réaction par ajout de 25 µl de SDS 3 %. La plaque est alors conservée à température ambiante.

Au terme de l'incubation ou le lendemain les plaques sont centrifugées 2 min à 125 g. 100 µl de chaque puits est prélevé puis distribué dans une plaque optique noire à fonds transparents en conservant le plan de plaque.

35 La lecture de la plaque est effectuée avec le lecteur de fluorescence avec les paramètres suivants :

- Excitation : 530/25 nm

- Emission : 590/20 nm
 - Lecture par le bas de la plaque (FOND)
 - Temps d'intégration : 20 μ s
 - Nombre de flashes : 25
- 5
- Gain : calculé à partir du puits pris dans le puits témoin ne contenant pas d'anticorps (cellules+ sérum+ milieu I5)
 - Agitation d'intensité 2 pendant 15 secondes en mode orbital

Caractérisation des isoformes par spectrométrie de masse

10 Les différentes isoformes de charge présentes dans les différentes fractions séparées par chromatofocalisation ou par chromatographie échangeuse de cations (CEX) ont été analysées par spectrométrie de masse comme décrit dans Chevreux-2011.

15 Cette méthode comprend l'utilisation d'une cystéine protéase bactérienne (IdeS, enzyme dégradant les immunoglobulines de *Streptococcus pyogenes*), qui clive spécifiquement les IgG sous leur domaine charnière, la chaîne lourde étant clivée en deux fragments de 25 kDa constitués respectivement des domaines VH-CH1 et CH2-CH3. Les fragments sont séparés par chromatographie liquide avec un gradient d'acétonitrile et analysés en spectrométrie de masse, par le protocole suivant :

20 100 μ g de fraction purifiée par chromatofocalisation ou par CEX ont été lyophilisés et redissous dans 20 μ l d'un tampon de digestion (50 mM NaH₂PO₂ et 150 mM NaCl, pH 6,30), et 100 UI d'enzyme IdeS ont été ajoutés en suivant les instructions du kit d'enzyme (FabRICATOR Kit, Genovis, Lund, Suède). La préparation a été incubée à 37°C pendant 1 heure sous assistance microonde à une puissance de 50

25 W (CEM Discover System, CEM, Matthews, NC, USA) pour améliorer l'hydrolyse. Ensuite, 25 μ l d'un tampon dénaturant (8M urée et 0,4M NH₄HCO₃, pH 8,0) ont été ajoutés, suivis de 5 μ l d'une solution de dithiothréitol (DTT) à 250 mM. L'échantillon a été incubé à 50 °C pendant 20 minutes sous assistance microonde à une puissance de 50 W pour assurer la réduction complète de la protéine, qui a ensuite

30 été analysée par chromatographie liquide-spectrométrie de masse (LC-MS).

Un aliquot du mélange réactionnel correspondant à une quantité de 20 μ g a été injecté sur une colonne ProSphere C4 à phase inverse (150 x 2,1 mM, 5 μ m, Alltech) équilibrée à 70°C à un flux de 350 μ l/min. La chromatographie en phase inverse a été réalisée en utilisant un système de chromatographie liquide ultra-

35 performante (UPLC, Acquity UPLC, Waters, Milford, MA, USA). Le gradient a été généré en utilisant de l'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,1% comme phase mobile A et de l'acétonitrile comprenant 0,1% de TFA comme phase mobile B. Après une

élution isocratique à 10% de B pendant 5 minutes, B a été augmenté à 27% pendant 5 minutes puis à 40% pour 10 minutes additionnelles. La colonne a ensuite été lavée pendant 3 minutes avec 90% de B et rééquilibrée pendant 2 minutes à 10% de B, donnant une durée globale de 25 minutes.

- 5 Les espèces éluées ont ensuite été analysées par un spectromètre de masse QSTAR (QSTAR XL, Applied Biosystems, Toronto, Canada) opérant en mode d'ion positif de 500 à 3000 m/z et calibré selon la procédure décrite par le fabricant pour la rénine.

Résultats

10 **Séparation des isoformes de charge par chromatofocalisation**

Les chromatogrammes des 3 séparations sont présentés sur la **Figure 1**, qui montre qu'ils sont parfaitement superposables, démontrant ainsi la reproductibilité de la méthode de séparation par chromatofocalisation. Du fait de l'utilisation d'une résine échangeuse d'anions et d'un gradient descendant de pH, les isoformes

15 basiques sont éluées les premières, suivies de l'isoforme majoritaire, puis des isoformes acides.

Les fractions 33 à 50 ont été récoltées pour analyses ultérieures de leurs propriétés biochimiques et effectrices.

20 **Séparation des isoformes de charge par chromatographie échangeuse de cations (CEX)**

Les chromatogrammes de 11 séparations par chromatographie échangeuse de cations (CEX) des isoformes de charge sont présentés sur la **Figure 2**. Du fait de l'utilisation d'une résine échangeuse de cations, les isoformes acides sont éluées les premières, suivies de l'isoforme majoritaire, puis des isoformes basiques.

- 25 Le pic 4 (P4, pic principal) a été réanalysé en CEX pour vérifier l'efficacité de la purification. Les pourcentages d'isoformes acides, principal et basiques obtenus avant et après séparation par CEX sont présentés sur la **Figure 3** et dans le **Tableau 4** ci-dessous, et montrent clairement l'efficacité de purification du pic principal.

30

Tableau 4. Pourcentages d'isoformes acides, principal et basiques obtenus avant et après séparation par CEX

Echantillon	Formes acides	Pic principal	Formes basiques
Avant séparation	12,6 %	58,7 %	28,7 %
Après séparation	3,5 %	93,4 %	3,1 %

Analyse de la liaison au récepteur CD16 par BIACORE

La capacité des différentes fractions séparées par chromatographie échangeuse de cations, comprenant différentes isoformes de charge, à lier le récepteur CD16 a été testée.

- 5 Les résultats sont présentés sur la **Figure 4**, et montrent une perte d'affinité pour les formes acides (P1 à P3) et pour le pic 7 (P7), mais pas pour les autres formes basiques (P6, P8).

Activation de cellules effectrices via CD16 (Test Jurkat CD16)

- 10 La capacité des différentes fractions séparées par chromatofocalisation et par chromatographie échangeuse de cations (CEX), comprenant différentes isoformes de charge, à induire une réponse de cellules effectrices via le récepteur CD16 (FcγRIII) a été testée.

Les résultats sont présentés dans la **Figure 5** (CEX), et le **Tableau 5** (séparation par chromatofocalisation) ci-dessous.

- 15 Dans chaque cas, on observe que la fraction correspondant à l'isoforme majoritaire induit une activation des cellules Jurkat CD16 significativement plus importante que les fractions comprenant les isoformes acides ou basique.

- Ainsi, la capacité des différents isoformes de charge à activer des cellules effectrices via CD16 varie significativement, l'isoforme majoritaire ayant une
20 capacité significativement améliorée par rapport aux autres isoformes à activer des cellules effectrices exprimant CD16.

- Le test décrit ci-dessus, qui mesure la quantité d'IL-2 sécrétée par des cellules Jurkat transfectées par le récepteur CD16 en présence d'une composition d'anticorps, a été montré comme représentatif de la capacité de cette composition
25 d'anticorps à induire l'ADCC par les cellules effectrices exprimant CD16 (WO2004/024768). Par conséquent, les résultats présentés dans les Tableaux 4 à 6 ci-dessous indiquent que les fractions purifiées correspondant au pic majoritaire de chromatofocalisation ou de CEX avant purification ont une capacité significativement améliorée par rapport aux autres isoformes et par rapport à une
30 composition totale comprenant tous les isoformes à induire l'ADCC via les cellules effectrices exprimant CD16.

Tableau 5. Activation des cellules Jurkat CD16 par une composition de référence, par la composition totale avant séparation, et par les fractions F36 (isoformes basiques), F39 (isoforme majoritaire), et F43, F44, F48, F49 et F50 (isoformes de plus en plus acides) d'une séparation par chromatofocalisation.

Echantillon	Activité Jurkat CD16 (% de la composition de référence)
composition de référence	100%
composition totale avant séparation	80%
F36 (isoforme basique)	62%
F39 (isoforme majoritaire)	96%
F43 (isoforme acide)	59%
F44 (isoforme acide)	71%
F48 (isoforme acide)	27%
F49 (isoforme acide)	38%
F50 (isoforme acide)	17%

5

Cytotoxicité dépendante du complément (CDC)

La capacité des différentes fractions séparées par chromatographie échangeuse de cations (CEX), comprenant différentes isoformes de charge, à induire une réponse cytotoxique dépendante du complément (CDC) a été mesurée.

- 10 Les résultats sont présentés sur la **Figure 6**, et montrent une forte perte d'activité pour les formes acides (P1 : 37%, P2 : 52%, et P3 : 69%) et les formes basiques (P5 : 45%, P6=K1 : 64%, P7 : 35%, et P8=K2 : 49%) par rapport au pic principal (P4). Le pic correspondant à l'isoforme majoritaire (P4) induit donc une réponse CDC significativement plus importante que les fractions comprenant les isoformes
- 15 acides ou basique.

Caractérisation des isoformes par spectrométrie de masse

Les fractions purifiées par chromatofocalisation et les fractions purifiées par CEX ont été analysées par LC-MS pour caractériser le pourcentage de chaînes lourdes avec ou sans lysine N-terminale.

- 20 Pour les fractions purifiées par chromatofocalisation et les fractions purifiées par CEX correspondant au pic majoritaire avant séparation, l'analyse a montré que plus de 95% des chaînes lourdes ne comprennent pas de lysine C-terminale.

Conclusion

Les résultats présentés ci-dessus montrent que les isoformes de charge d'une composition d'anticorps correspondant au pic majoritaire d'une séparation par chromatographie échangeuse d'ions (CEX) ou par chromatofocalisation ont une capacité significativement plus grande que les isoformes acides ou basiques de la même composition d'anticorps à activer les cellules effectrices via le récepteur FcγRIII (CD16), et également via le complément.

L'utilisation de fractions purifiées correspondant à ce pic majoritaire permettrait donc d'augmenter encore les propriétés effectrices via CD16 (ADCC, sécrétion de cytokines) dans le cadre de pathologies traitées par des anticorps monoclonaux dans lesquelles l'ADCC ou la réponse CDC joue un rôle important, telles que notamment la prévention de l'alloimmunisation, ou le traitement des cancers, des maladies infectieuses, et des maladies auto-immunes.

Références bibliographiques

- 15 Ahmad et al. FASEB J. 1996. 10 :258-266.
Albrecht MT, et al. INFECTION AND IMMUNITY, Nov. 2007, p. 5425–5433.
Almagro et al. Frontiers in Bioscience 13, 1619-1633, January 1, 2008.
Antes B, et al. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007 Jun 1;852(1-2):250-6.
- 20 Beliard R et al. Br J Haematol. 2008 Apr;141(1):109-19.
Bruggermann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993);
Cardarelli et al. Clin Cancer Res 2009 April 28;15:3376-3383,
Cardarelli et al. Cancer Immunol Immunother. 2010. 59. 257-265,
Cartron G, et al. Blood. 2002 Feb 1;99(3):754-8.
- 25 Casadevall A. et al. Emerg Infect Dis. 2002 Aug;8(8):833-41 ;
Chan AC, et al. Nat Rev Immunol. 2010 May;10(5):301-16.
Chevreux G et al. Anal Biochem. 2011 Aug 15;415(2):212-4 ;
Cibelli et al., 1998 Science, 280 : 1256-1258
Dall'Acqua et al. 2002, J Immunol.;169:5171 -80.
- 30 Dall'Acqua et al. 2006, J. Biol. Chem.;281 :23514-24. (a)
Dall'Acqua et al. J Immunol 2006; 177:1129-1138. (b)
Duchosal et al. Nature 355:258 (1992)
Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969).
Edwards JC, et al. Nat Rev Immunol. 2006 May;6(5):394-403.
- 35 EP1176195A1,

- EP1308456,
EP1829961,
Farnan D, Moreno GT. *Anal Chem.* 2009 Nov 1;81(21):8846-57.
Fisher R, et al. *Vaccine* 21 (2003) 820–825.
- 5 Forthal et al, *J Immunol* 2010;185:6876-6882,
Gandhi S, et al. *Pharm Res.* 2012 Jan;29(1):209-24.
Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)
Gordon et al., 1980 *Proc Natl Acad Sci U S A.*;77:7380-4
Herbst R. et al. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010 Oct;335(1):213-22,
- 10 Hinton et al. 2004, *J Biol Chem.* ;279:6213-6.
Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991);
Ianello A, et al. *Cancer and Metastasis Reviews* 24: 487–499, 2005.
Idusogie EE et al. *J Immunol.* 2001; 166:2571-5.
Imai-Nishiya et al, *BMC Biotechnology* 2007, 7:84 ;
- 15 Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:2551 (1993) (a);
Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993) (b);
Jones et al. *Nature*, 321 : 522-525, 1986 ;
Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991).
- 20 Kanda Y et al, *Journal of Biotechnology* 130 (2007) 300–310,
Khawli LA, et al. *MAbs.* 2010 Nov-Dec;2(6):613-24.
Lazar, G. A., et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(11): 4005-10.
Ma JK, et al. *Nat Rev Genet.* 2003 Oct;4(10):794-805.
Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, Second edition, Cold Spring
25 Harbor Laboratory Press (1994);
Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581- 5 597 (1991);
McAtee CP et al. *Curr Protoc Protein Sci.* 2012 Aug;Chapter 8:Unit 8.10,
Miao C, et al. *Journal of General Virology* (2009), 90, 1119–1123.
Moore GL. Et al. *mAbs* 2:2, 181-189; March/April, 2010;
- 30 Mori K, et al. *Biotechnol Bioeng.* 2004 Dec 30;88(7):901-8,
Olivier S. et al. *MAbs.* 2010 Jul-Aug; 2(4): 405–415,
Presta LG. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006 Aug 7;58(5-6):640-56.
Rea JC, et al. *J Pharm Biomed Anal.* 2011 Jan 25;54(2):317-23.
Rea Jennifer C. *Innovations in Biotechnology.* InTech. February 17, 2012. Chapter
35 19.
Riechmann et al. *Nature*, 332 : 323-327, 1988,

- Ryan et al, 1997 Science; 278: 873 - 876 ;
Sato M, et al. Expert Opin Biol Ther. 2006 Nov;6(11):1161-73.
Schillberg S, et al. Vaccine 23 (2005) 1764–1769.
Shields RL, et al. J Biol Chem. 2001 Mar 2;276(9):6591-604.
- 5 Stoger E, et al. Molecular Breeding 9: 149–158, 2002.
Suzuki et al. Clin Cancer Res 2007 March 15;13:1875-1882,
Umana et al. Nat Biotechnol. 1999 Feb;17(2):176-80,
US5,591,669,
US 5,598,369,
- 10 US 5,545,806,
US 5,545,807,
US 6,150,584
Vaughan et al. Nature Biotech 14:309 (1996)
Velders MP et al, Br J Cancer. 1998 Aug;78(4):478-83.
- 15 Verhoeyn et al. BioEssays, 8 : 74, 1988,
Verhoeyen et al. Science, 239 : 1534-1536, 1988 ;
Vlasak J, Ionescu R. Curr Pharm Biotechnol. 2008 Dec;9(6):468-81.
Wallace PK et al, J Leukoc Biol. 1994 Jun;55(6):816-26.
Weiner LM, et al. Nat Rev Immunol. 2010 May;10(5):317-27.
- 20 WO9004036A1,
WO9517085A1,
WO9951642,
WO0026357A2,
WO00/42072,
- 25 WO01/77181,
WO01/26455A1,
WO02/060919A2,
WO2004/024768,
WO2004/024866,
- 30 WO2004/029207,
WO2004/050847A2,
WO2004/063351
WO2004/074455
WO2005/033281A2,
- 35 WO2007/048077A2
WO2007/106078A2,
WO2010/045193,

WO2010/106180A2,

WO2011/009623,

WO2012/041768A1

Wright A, Morrison SL. J Exp Med. 1994 Sep 1;180(3):1087-96,

5 Yamane-Ohnuki N. et al. Biotechnol Bioeng. 2004 Sep 5;87(5):614-22,

Zeitlin L. et al. Microbes Infect. 2000 May;2(6):701-8,

Zhang T. et al. J Chromatogr A. 2011 Aug 5;1218(31):5079-86.

Revendications

1. Composition d'anticorps monoclonal susceptible d'être obtenue par un procédé comprenant :
 - 5 a) la production d'une composition d'anticorps monoclonal à partir d'un clone cellulaire, d'un animal non-humain transgénique ou d'une plante transgénique,
 - b) le fractionnement de la composition obtenue à l'étape a) par chromatographie, et
 - 10 c) le regroupement d'une ou plusieurs fractions chromatographiques obtenues à l'étape b), correspondant au pic majoritaire du chromatogramme, la composition d'anticorps monoclonal ainsi obtenue étant enrichie dans ledit pic majoritaire, celui-ci représentant au moins 85% du chromatogramme de la composition obtenue à l'étape c),
pour son utilisation en tant que médicament.
- 15 2. Composition d'anticorps monoclonal selon la revendication 1 pour son utilisation en tant que médicament selon la revendication 1, caractérisée en ce que le fractionnement de l'étape b) est réalisé par chromatographie échangeuse d'ions, par chromatofocalisation, ou par chromatographie d'interactions hydrophobes.
- 20 3. Composition d'anticorps monoclonal selon la revendication 2 pour son utilisation en tant que médicament selon la revendication 2, caractérisée en ce que la chromatographie échangeuse d'ions utilise l'un des moyens d'élution suivants :
 - gradient de force ionique ; et/ou
 - 25 • gradient de pH ; ou
 - molécule de déplacement.
- 30 4. Composition d'anticorps monoclonal selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 pour son utilisation en tant que médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'au moins 95% des chaînes lourdes des anticorps présents dans la composition ne comprennent pas de résidu lysine en C-terminal.
- 35 5. Composition d'anticorps monoclonal, dans laquelle au moins 95% des chaînes lourdes des anticorps présents dans la composition ne comprennent pas de résidu lysine en C-terminal, pour son utilisation en tant que médicament.

6. Composition d'anticorps monoclonal selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 pour son utilisation en tant que médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l'anticorps est dirigé contre un antigène non ubiquitaire présent sur des cellules de donneur sain, un antigène d'une cellule cancéreuse, un antigène d'une cellule infectée par agent pathogène, ou un antigène d'une cellule immunitaire.
7. Composition d'anticorps monoclonal selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour son utilisation en tant que médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'anticorps est un anticorps anti-Rhésus D et la composition est destinée à la prévention de l'alloimmunisation chez les individus Rhésus-négatifs.
8. Composition d'anticorps monoclonal selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour son utilisation en tant que médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'anticorps est dirigé contre un antigène d'une cellule cancéreuse et la composition est destinée au traitement d'un cancer.
9. Composition d'anticorps monoclonal selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour son utilisation en tant que médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'anticorps est dirigé contre un antigène d'une cellule infectée par agent pathogène et la composition est destinée au traitement d'une infection par ledit organisme pathogène.
10. Composition d'anticorps monoclonal selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour son utilisation en tant que médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'anticorps est dirigé contre un antigène d'une cellule immunitaire et la composition est destinée au traitement d'une maladie autoimmune.
11. Composition d'anticorps monoclonal selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 pour son utilisation en tant que médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que l'anticorps comprend une modification du fragment Fc augmentant sa liaison au récepteur Fc γ RIII et ses propriétés effectrices via le récepteur Fc γ RIII.
12. Composition d'anticorps monoclonal selon la revendication 11 pour son utilisation en tant que médicament selon la revendication 11, caractérisée en ce que

l'anticorps comprend au moins une mutation au niveau de certains résidus acides aminés du fragment Fc.

- 5 13. Composition d'anticorps monoclonal selon la revendication 11 ou la revendication 12 pour son utilisation en tant que médicament selon la revendication 11 ou la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle comprend une teneur en fucose inférieure ou égale à 65%.
- 10 14. Composition d'anticorps monoclonal selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 pour son utilisation en tant que médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que l'anticorps comprend une modification du fragment Fc augmentant sa liaison à la protéine C1q et ses propriétés effectrices via le complément
- 15 15. Utilisation d'une étape de fractionnement par chromatographie pour augmenter la capacité d'une composition d'anticorps monoclonal dirigé contre un anticorps donné à induire la cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC) de cellules cibles exprimant ledit antigène par les cellules effectrices du système immunitaire exprimant le récepteur FcγRIII (CD16).
- 20 16. Utilisation d'une étape de fractionnement par chromatographie pour augmenter la capacité d'une composition d'anticorps monoclonal dirigé contre un anticorps donné à induire la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) de cellules cibles exprimant ledit antigène par le complément.
- 25

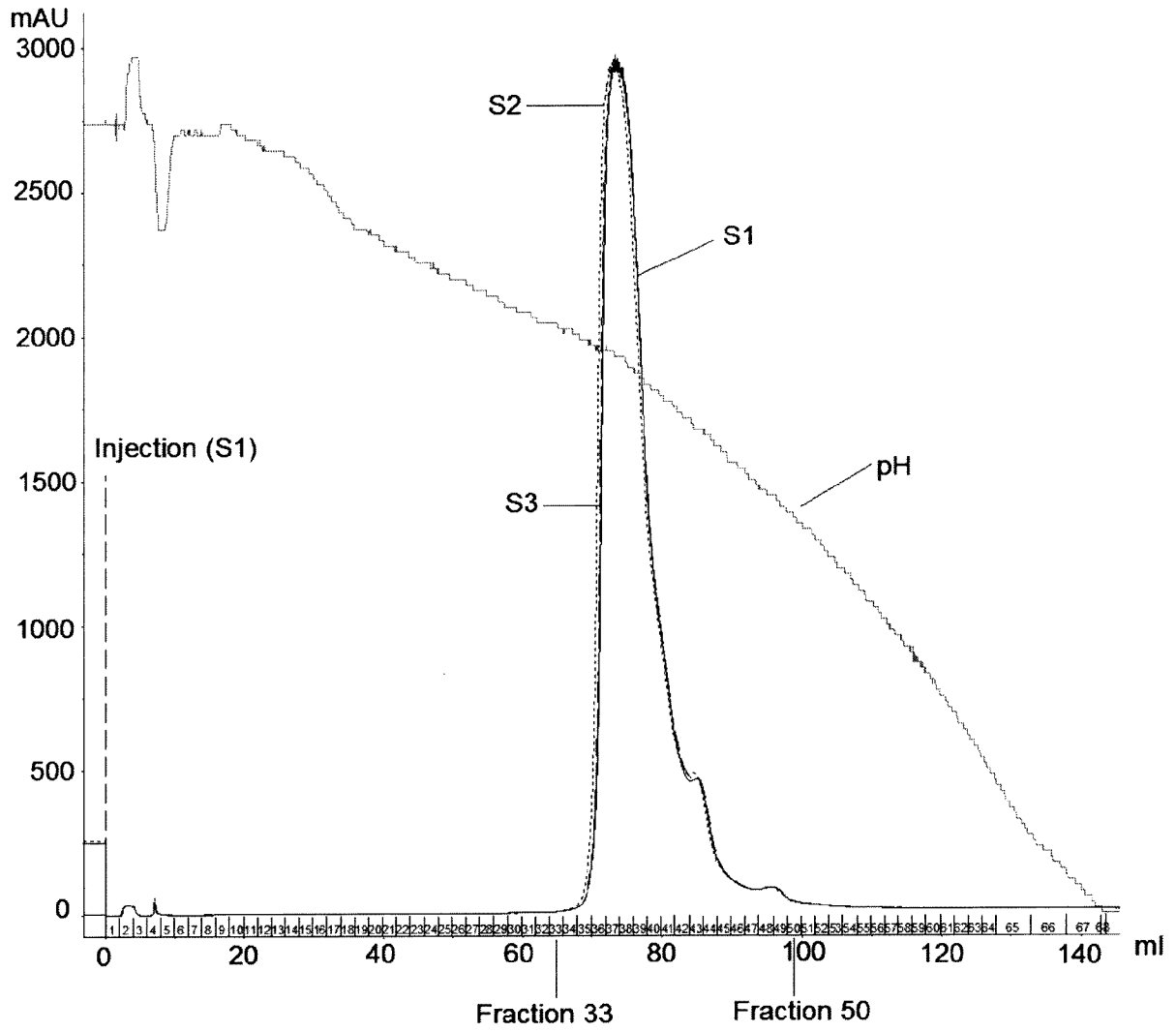


Figure 1

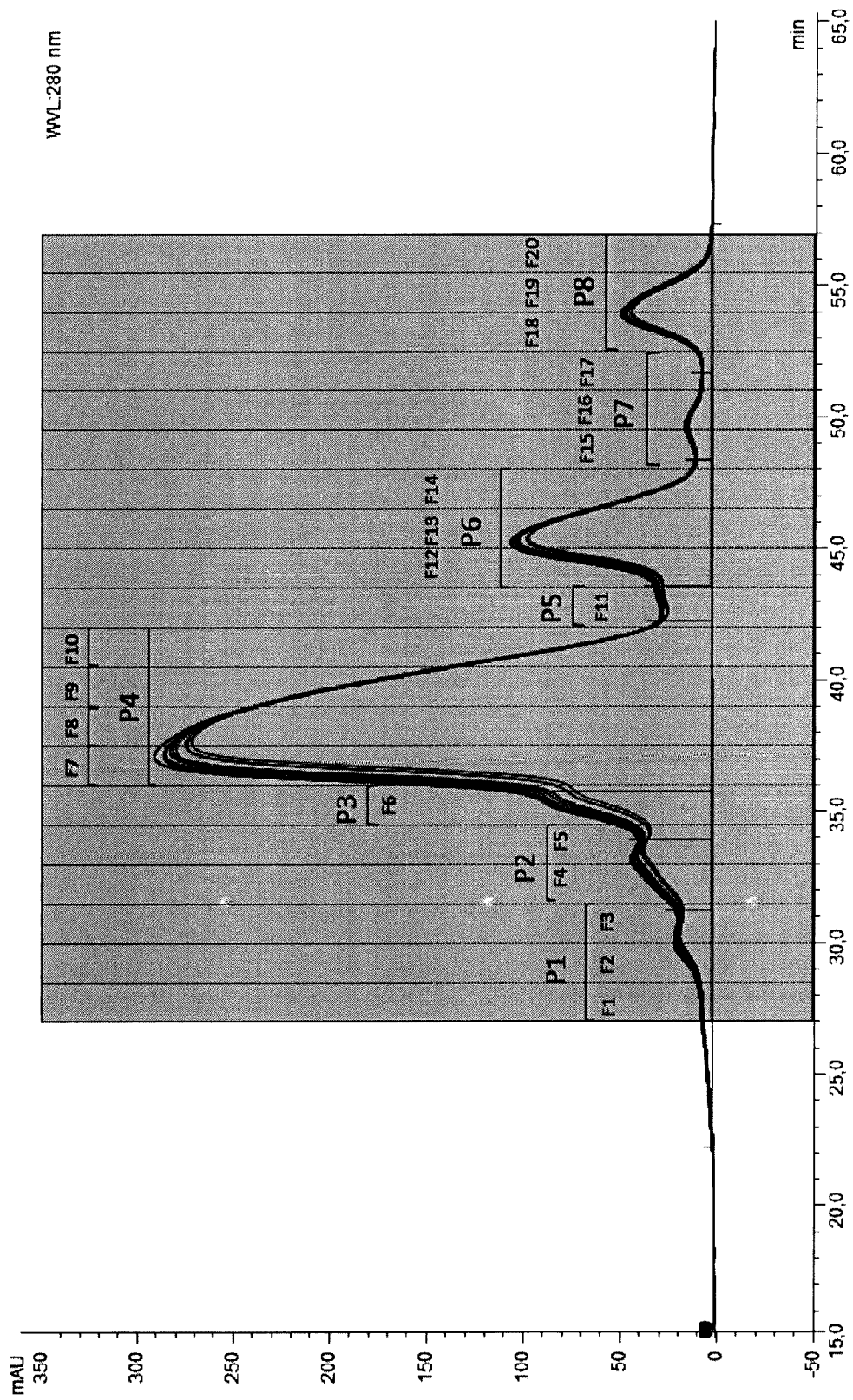


Figure 2

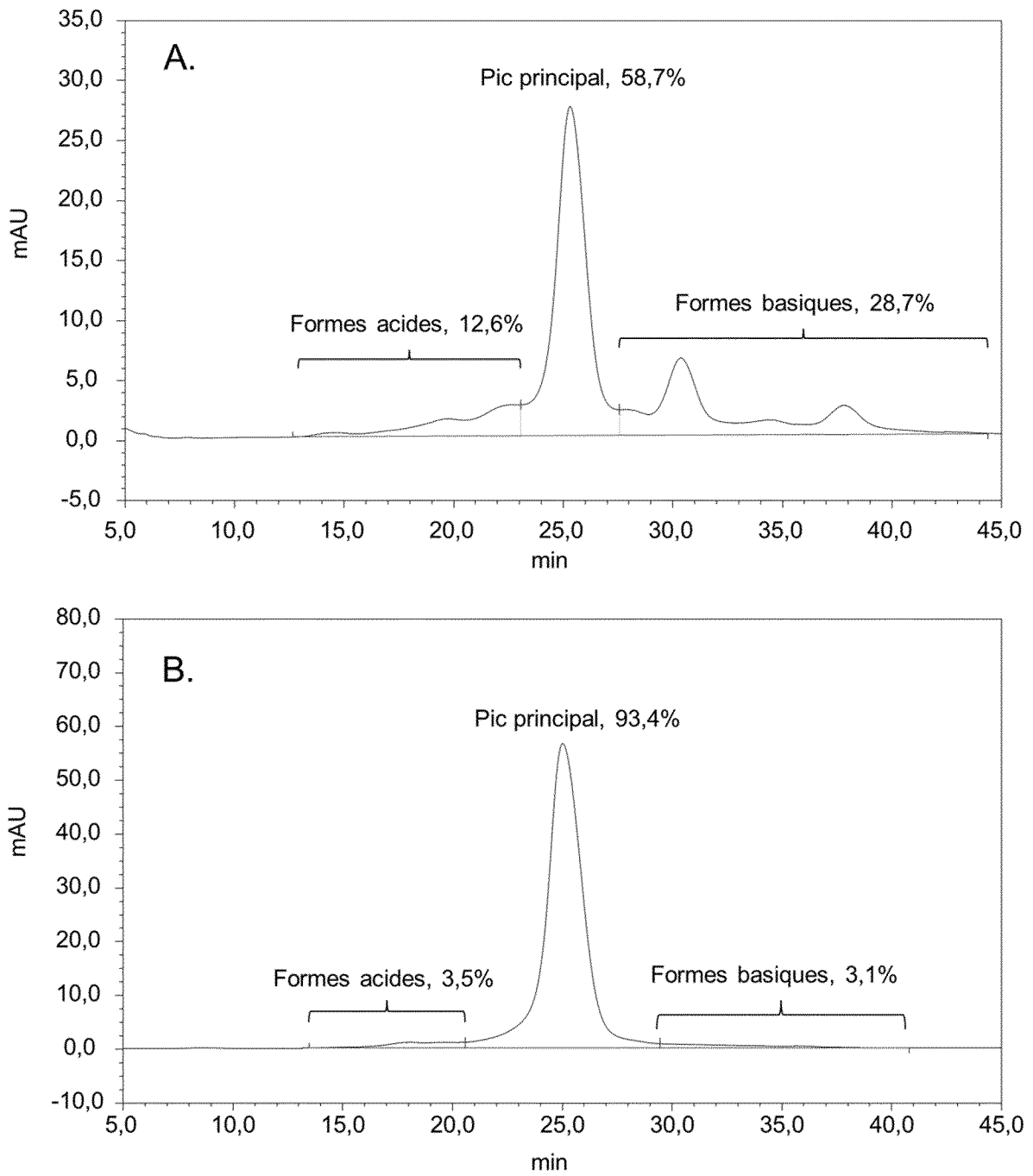


Figure 3

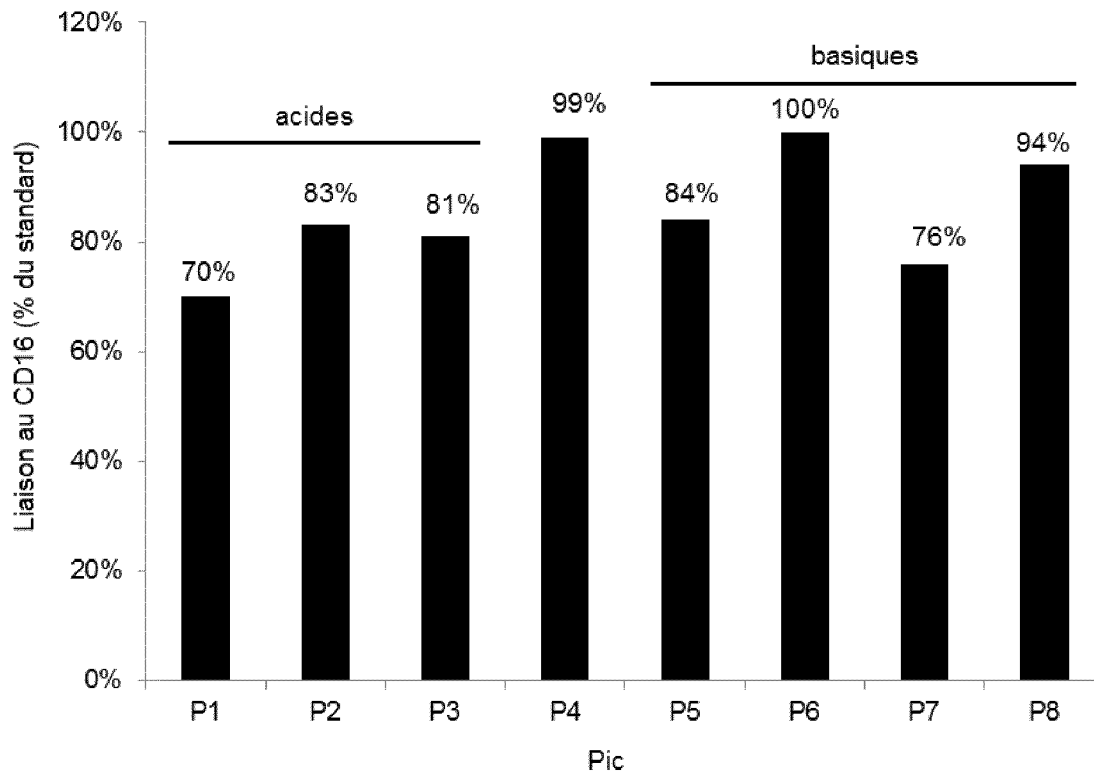


Figure 4

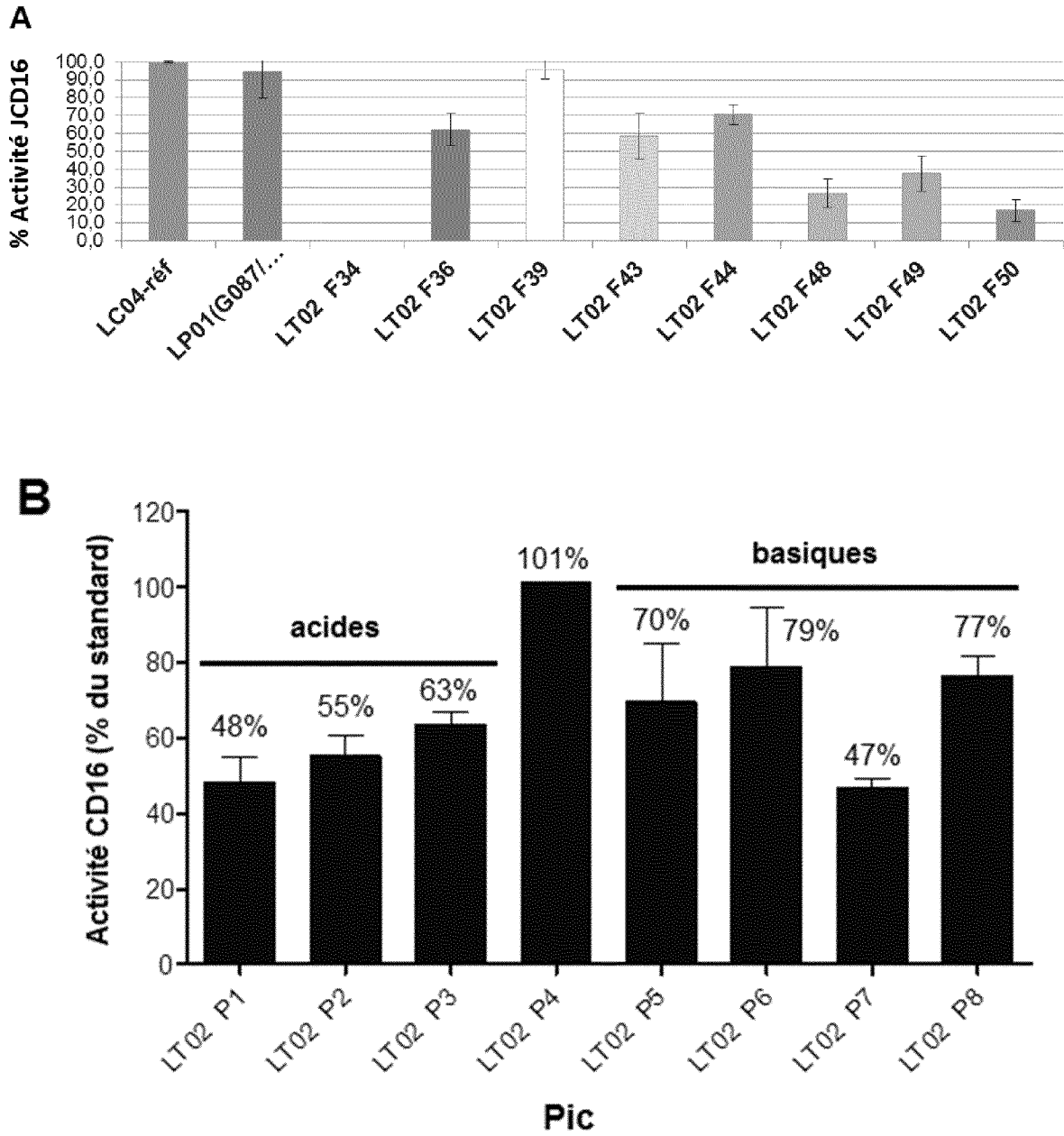


Figure 5

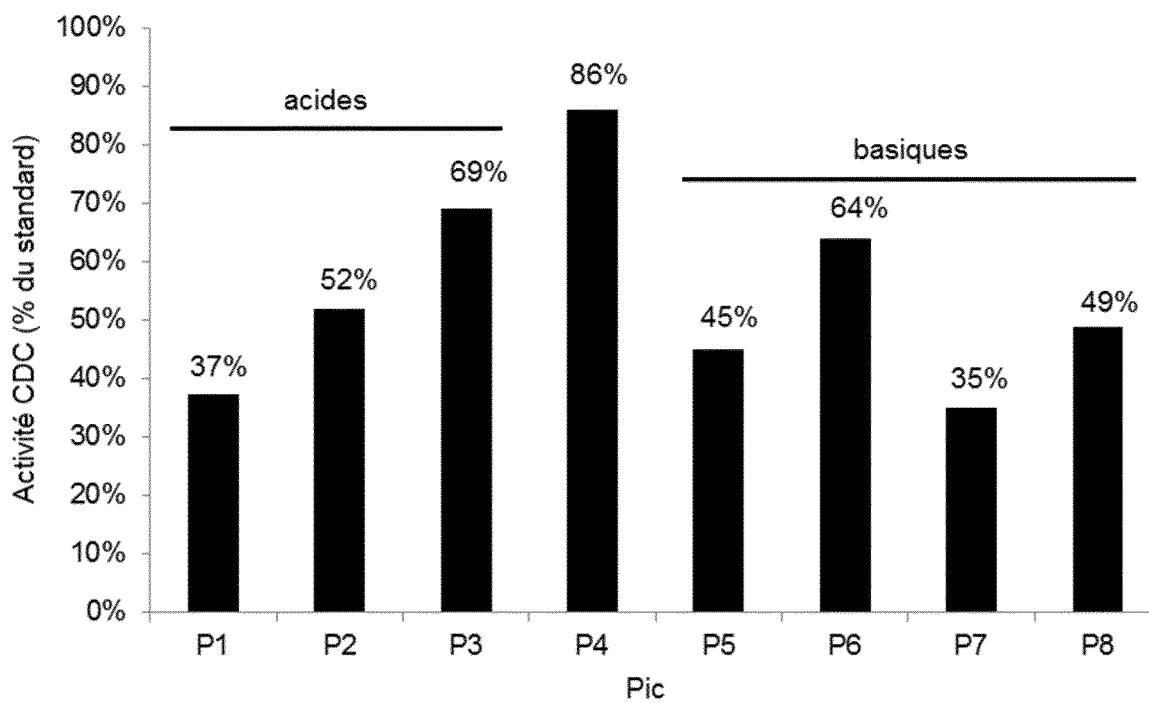


Figure 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/055179

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/395 C07K1/16
ADD.
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)
A61K C07K
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, 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 2013/004841 A1 (GENMAB AS [DK]; PARREN PAUL [NL]; VAN BERKEL PATRICK [NL]; VAN DEN BRE) 10 January 2013 (2013-01-10) example 4	1-16
A	WO 2006/099875 A1 (GENMAB AS [DK]; WEERS MICHEL DE [NL]; GRAUS YVO [NL]; OPRINS JUDITH [N]) 28 September 2006 (2006-09-28) the whole document	1-16

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 6 May 2014	Date of mailing of the international search report 13/05/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Wagner, René

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/055179

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>YI DU ET AL: "Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies", MABS, vol. 4, no. 5, 1 September 2012 (2012-09-01), pages 578-585, XP055077895, ISSN: 1942-0862, DOI: 10.4161/mabs.21328 page 582</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	15,16
A	<p>TAYLOR ZHANG ET AL: "Isolation and characterization of therapeutic antibody charge variants using cation exchange displacement chromatography", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V, NL, vol. 1218, no. 31, 17 May 2011 (2011-05-17), pages 5079-5086, XP028236720, ISSN: 0021-9673, DOI: 10.1016/J.CHROMA.2011.05.061 [retrieved on 2011-05-27] the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/055179

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013004841 A1	10-01-2013	EP 2729496 A1 WO 2013004841 A1	14-05-2014 10-01-2013

WO 2006099875 A1	28-09-2006	AU 2006226733 A1 BR PI0608927 A2 CA 2602375 A1 CN 101218256 A EA 200702053 A1 EA 201100694 A1 EP 1866338 A1 EP 2535355 A2 EP 2551282 A2 EP 2567976 A2 JP 5225069 B2 JP 2008533977 A JP 2012070737 A KR 20070116137 A NZ 561883 A NZ 586780 A US 2009148449 A1 US 2011099647 A1 WO 2006099875 A1 ZA 200709003 A	28-09-2006 09-11-2010 28-09-2006 09-07-2008 28-02-2008 28-02-2012 19-12-2007 19-12-2012 30-01-2013 13-03-2013 03-07-2013 28-08-2008 12-04-2012 06-12-2007 26-11-2010 24-02-2012 11-06-2009 28-04-2011 28-09-2006 27-05-2009

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2014/055179

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A61K39/395 C07K1/16 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) A61K C07K					
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche					
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, 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 2013/004841 A1 (GENMAB AS [DK]; PARREN PAUL [NL]; VAN BERKEL PATRICK [NL]; VAN DEN BRE) 10 janvier 2013 (2013-01-10) exemple 4	1-16			
A	WO 2006/099875 A1 (GENMAB AS [DK]; WEERS MICHEL DE [NL]; GRAUS YVO [NL]; OPRINS JUDITH [N]) 28 septembre 2006 (2006-09-28) le document en entier	1-16			
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 33%;"><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents</td> <td style="width: 33%;"><input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</td> <td style="width: 34%;"></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 6 mai 2014		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 13/05/2014			
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 Wagner, René			

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>YI DU ET AL: "Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies", MABS, vol. 4, no. 5, 1 septembre 2012 (2012-09-01), pages 578-585, XP055077895, ISSN: 1942-0862, DOI: 10.4161/mabs.21328 page 582</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	15,16
A	<p>TAYLOR ZHANG ET AL: "Isolation and characterization of therapeutic antibody charge variants using cation exchange displacement chromatography", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V, NL, vol. 1218, no. 31, 17 mai 2011 (2011-05-17), pages 5079-5086, XP028236720, ISSN: 0021-9673, DOI: 10.1016/J.CHROMA.2011.05.061 [extrait le 2011-05-27] le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-16

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2014/055179

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2013004841 A1	10-01-2013	EP 2729496 A1	14-05-2014
		WO 2013004841 A1	10-01-2013

WO 2006099875 A1	28-09-2006	AU 2006226733 A1	28-09-2006
		BR PI0608927 A2	09-11-2010
		CA 2602375 A1	28-09-2006
		CN 101218256 A	09-07-2008
		EA 200702053 A1	28-02-2008
		EA 201100694 A1	28-02-2012
		EP 1866338 A1	19-12-2007
		EP 2535355 A2	19-12-2012
		EP 2551282 A2	30-01-2013
		EP 2567976 A2	13-03-2013
		JP 5225069 B2	03-07-2013
		JP 2008533977 A	28-08-2008
		JP 2012070737 A	12-04-2012
		KR 20070116137 A	06-12-2007
		NZ 561883 A	26-11-2010
		NZ 586780 A	24-02-2012
		US 2009148449 A1	11-06-2009
		US 2011099647 A1	28-04-2011
		WO 2006099875 A1	28-09-2006
		ZA 200709003 A	27-05-2009
