

(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
4 avril 2002 (04.04.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/26830 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C07K 16/00, A61K 39/395 // C07K 16/18

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/02972

(22) Date de dépôt international :
25 septembre 2001 (25.09.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/12384 28 septembre 2000 (28.09.2000) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **IMTIX SANGSTAT** [FR/FR]; 58, avenue Debourg, B.P. 7055, F-69348 Lyon Cedex 07 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **TIOL-
LIER, Jérôme** [FR/FR]; 18, rue des Chevaucheurs,
F-69005 Lyon (FR). **SORLIN, Laurent** [FR/FR]; 25,
avenue Serrullaz, F-69670 Vaugneray (FR).

(74) Mandataire : **MONCHENY, Michel**; Cabinet Lavoix, 2,
place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).

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

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

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

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

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING HUMAN ANTI-THYMOCYTE IMMUNOGLOBULINS

(54) Titre : PROCEDE DE PRODUCTION D'IMMUNOGLOBULINES ANTI-THYMOCYTES HUMAINS

(57) Abstract: The invention concerns a method for producing human anti-thymocyte immunoglobulins comprising steps which consist in: (a) injecting a cellular preparation of human thymocytes to an animal free of specified pathogenic organisms; (b) collecting the serum produced by the animal; (c) separating the human anti-thymocyte immunoglobulins from the serum, without adsorption on the human biological material.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet un procédé de production d'immunoglobulines anti-thymocytes humains qui comprend les étapes consistant à : (a) injecter une préparation cellulaire de thymocytes humains à un animal exempt d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) ; (b) recueillir le sérum immun produit par l'animal ; (c) isoler les immunoglobulines anti-thymocytes humains du sérum, sans adsorption sur du matériel biologique humain.



WO 02/26830 A1

Procédé de production d'immunoglobulines anti-thymocytes humains

La présente invention se rapporte à un procédé de production d'immunoglobulines anti-thymocytes humains.

Les anticorps ou immunoglobulines (Ig) anti-thymocytes humains sont connus comme immunosuppresseurs sélectifs. Ils agissent sur la
5 réponse immunitaire en diminuant par déplétion, selon différents mécanismes, la quantité des lymphocytes circulants du sang et des différents tissus lymphoïdes et probablement en bloquant ou modulant leurs récepteurs. Leur utilisation est indiquée dans le cadre des transplantations d'organes, pour la prévention et le traitement des rejets de greffes, ainsi que
10 pour le traitement de la réaction du greffon contre l'hôte aiguë. Ces immunoglobulines ont également été proposées dans le traitement de l'aplasie médullaire.

Des préparations de ce type d'immunoglobulines-étaient initialement obtenues par injection de cellules lymphatiques chez l'animal, lapin ou
15 cheval par exemple, puis par extraction des immunoglobulines anti-thymocytes à partir du sérum immun. Toutefois, le niveau de pureté de ces préparations était insuffisant pour rendre ces immunoglobulines utilisables, notamment en thérapie (Guttman, R.D., 1967, J. Exp. Med., 126:1099-1127). Des immunoglobulines anti-érythrocytes humains ou anti-membrane basale
20 étaient en particulier produites par l'animal au cours de l'immunisation. Plusieurs hypothèses expliquent l'apparition de ces immunoglobulines : soit les suspensions thymocytaires renferment des traces d'hématies (Rolland, J.M, 1972, Pathology, 4(2) : 85-122), soit il existe des antigènes de surface communs entre les cellules T, B et les érythrocytes, ce qui à l'heure actuelle
25 est l'hypothèse la plus vraisemblable.

Des techniques ont alors été développées afin d'améliorer la pureté de la préparation. Ces techniques prévoyaient une étape d'hémadsorption, à savoir une adsorption sur des hématies humaines.

Cette étape d'hémadsorption permet l'élimination de la majeure
30 partie des anticorps indésirables, tels que les anticorps anti-érythrocytes présents dans le sérum immun initial.

Une étape d'élimination des anticorps anti-tissulaires sur tissus humains (comme le placenta) était également parfois prévue, afin d'adsorber les anticorps anti-membrane basale en particulier.

Plusieurs immunoglobulines anti-thymocytes humains préparées
5 selon ces techniques sont maintenant disponibles sur le marché, tels que la Thymoglobuline® (Imtix-Sangstat), le Tecelac® (Biotest), ou encore l'ATGF® (Fresenius), ou l'ATGAM (Upjohn).

Néanmoins, les procédés décrits qui comprennent une étape d'adsorption sur hématies ou tissus humains présentent encore des
10 inconvénients.

En particulier, on observe, lors de la mise en œuvre de ces procédés, une diminution de 30% du taux de gammaglobulines contenues dans le sérum, et donc d'une partie non négligeable des anticorps d'intérêt. En outre, l'élimination des anticorps anti-érythrocytes indésirables n'est pas
15 totale. Or, ceux-ci seraient susceptibles de provoquer l'apparition d'anémies hémolytiques chez les patients traités. Enfin, l'utilisation de matériel humain, tels que des érythrocytes, même purifiés et sécurisés, dans le procédé d'isolement des immunoglobulines anti-thymocytes humains augmente le risque potentiel d'infection.

20 Les auteurs de la présente invention ont donc cherché à mettre au point un procédé amélioré pour la production d'immunoglobulines anti-thymocytes humains.

La présente invention se rapporte à un procédé sans étape d'adsorption sur du matériel biologique humain, pour l'obtention d'une
25 préparation d'immunoglobulines anti-thymocytes suffisamment pure, pour une utilisation en thérapie notamment.

Plus précisément, l'invention a pour objet un procédé de production d'immunoglobulines anti-thymocytes humains purifiés qui comprend les étapes consistant à :

30 (a) injecter une préparation cellulaire de thymocytes humains à un animal exempt d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) ;

(b) recueillir le sérum immun produit par l'animal ;

(c) isoler les immunoglobulines anti-thymocytes humaines du sérum, sans adsorption sur du matériel biologique humain.

De manière plus particulière, on entend par "immunoglobulines du sérum" la fraction totale des gammaglobulines du sérum après immunisation.

Par "adsorption sur du matériel biologique humain", on entend notamment une hémasorption sur hématies ou une adsorption sur tissus humains (tels que placenta notamment), stroma ou extraits grossiers de ces tissus.

Les animaux EOPS (ou SPF pour « Specific-pathogen free ») sont des animaux d'élevage dont l'environnement ainsi que l'alimentation sont strictement contrôlés selon des normes sanitaires. On parle également d'animaux « au statut sanitaire contrôlé » (SCC). Les animaux EOPS sont élevés dans des habitats fermés stérilisés, l'environnement d'air étant filtré, par exemple sur filtre HEPA (filtration stérilisante), et l'eau et les aliments étant décontaminés avant introduction, ce qui permet l'élimination de tout élément pathogène de leur environnement direct (Yanabe et al. Exp. Animal 48(2), 101-106 (1999)). Le terme "pathogène" désigne ici un agent infectieux capable de causer une maladie clinique et/ou d'altérer la réponse biologique de l'animal au regard de l'utilisation souhaitée. Le statut EOPS se réfère à une liste (évolutive) de germes et de méthode de contrôle (clinique, sérologique, de culture ou histologique) pour détecter les microorganismes ciblés ou au contraire démontrer leur absence.

On utilise de manière préférentielle le cheval ou la chèvre, de préférence encore le lapin, pour la production de sérum immun. En effet, seules des IgG1 sont présentes dans le sérum de lapin, ce qui facilite le processus de purification des anticorps. L'IgG de lapin montre en outre une forte affinité pour le récepteur Fc des humains, permettant le développement d'anticorps cytotoxiques puissants dirigés contre les cellules T humaines.

La préparation cellulaire de thymus humains peut être obtenue soit à partir de cellules de lignées en culture, soit à partir de thymocytes frais qui

sont purifiés préférentiellement à partir de fragments de thymus humains soit éventuellement à partir, par exemple, de suspensions de rate, d'amygdales, de ganglions lymphatiques, de trachée thoracique ou encore de sang périphérique. Les fragments de thymus humains peuvent être notamment
5 facilement prélevés lors d'actes chirurgicaux, notamment à la suite de chirurgies cardiaques sur des enfants. Des tests virologiques sont réalisés sur le sang du donneur pour éviter toute contamination et éliminer tout fragment thymique contaminé, montrant un résultat sérologique positif.

L'injection des thymocytes humains et la collecte du sérum immun
10 sur l'animal EOPS sont réalisées selon les techniques standards de l'homme du métier.

L'isolement des immunoglobulines anti-thymocytes humains du sérum permet l'élimination des protéines indésirables. Il peut être réalisé en mettant par exemple en œuvre une chromatographie échangeuse d'ions, de
15 préférence sur colonne et/ou une ou plusieurs précipitations.

De manière avantageuse, une telle précipitation peut être réalisée en deux étapes successives au moyen d'un réactif précipitant les immunoglobulines. Le réactif préférentiellement utilisé est le sulfate de sodium.

20 L'étape chromatographique permet la rétention des impuretés chargées par une résine échangeuse d'ions tels que des anions (DEAE). Les IgG quant à elles ne sont pas retenues par la colonne et sont évacuées rapidement de la colonne, ce qui permet de les récolter de manière sélective. Une chromatographie sur colonne d'affinité spécifique, éliminant
25 les anticorps indésirables restant, est également avantageuse.

L'invention a également pour objet les immunoglobulines anti-thymocytes humains isolées susceptibles d'être préparées par le procédé de l'invention.

Ces immunoglobulines peuvent également être désignées
30 "immunoglobulines anti-lymphocytes humains" puisqu'elles reconnaissent les

lymphocytes humains lorsqu'elles sont mises en présence de ceux-ci, par exemple lors d'injections à des patients en vue d'une immunodéplétion.

La présente invention vise d'ailleurs également l'utilisation de ces immunoglobulines pour la fabrication d'un médicament destiné à diminuer la
5 quantité de lymphocytes circulants du sang et des tissus lymphoïdes chez un patient humain.

L'invention a également pour objet une méthode de traitement thérapeutique dans laquelle on administre à un patient nécessitant une diminution de sa quantité de lymphocytes une quantité thérapeutiquement
10 efficace des immunoglobulines ainsi obtenues. Ces immunoglobulines sont particulièrement utiles dans le cadre des transplantations d'organes.

Les immunoglobulines anti-thymocytes humains préparées selon le procédé décrit plus haut présentent une plus grande activité spécifique que les immunoglobulines anti-thymocytes préparées au moyen d'un procédé
15 incluant une étape d'hémadsorption, comme cela ressort dans l'exemple 2.1 présenté ci-après.

La suppression de l'étape d'adsorption sur matériel biologique humain permet la fabrication d'immunoglobulines en l'absence de tout contact avec un dérivé humain. Ceci conduit à l'élimination de toute
20 contamination éventuelle virale ou d'agents non conventionnels de type prion. En outre, on évite toute contamination associée à une hémadsorption, à savoir une contamination par l'hémoglobine relarguée par les hématies humaines lors de l'hémolyse engendrée par cette étape.

Le procédé de l'invention permet d'obtenir une préparation
25 d'immunoglobulines anti-thymocytes dans laquelle le nombre d'immunoglobulines susceptibles de réactions croisées avec d'autres cellules sanguines (érythrocytes, neutrophiles, ...) est considérablement réduit. De plus, le fait de ne pas utiliser d'hémadsorption dans la préparation des anticorps anti-thymocytes permet non seulement d'améliorer l'aspect
30 sécuritaire mais réduit également la durée et le coût du procédé de préparation. En effet, de manière classique, l'hémadsorption utilise des

globules rouges humains entiers, frais et formolés, et nécessite des quantités importantes de cellules à traiter, rendant l'obtention des immunoglobulines anti-thymocytes relativement contraignante au niveau industriel.

5

Les exemples suivants illustrent l'invention sans en limiter la portée.

EXEMPLES :

10

EXEMPLE 1 : Production d'immunoglobulines

1.1 Purification des thymocytes :

Des fragments de thymus humains sont, après prélèvement et dilacération, filtrés et mis en suspension.

15

La suspension cellulaire est ensuite filtrée sur un tissu en Nylon et soumise à une centrifugation à 1 800 tours/min à 5°C.

20 ml de Ficoll sont ajoutés à 10 ml de solution cellulaire contenant de $2 \text{ à } 7 \cdot 10^9$ cellules et l'ensemble est centrifugé à 2 000 tours/min à 5°C. Deux centrifugations subséquentes sont réalisées à 1 800 tours/min. Les préparations cellulaires sont ensuite stockées à 5°C pendant une nuit puis sont diluées avant injection à des lapins EOPS. Les thymocytes peuvent également être conservés par congélation.

20

1.2 Isolement des anticorps :

25

Le sérum immun de lapin est recueilli au cours de plusieurs saignées entre J20 et J30 et peut être congelé pour le stockage. Lors de la préparation, on forme des lots de sérum qui sont ramenés progressivement à température ambiante.

Ces lots de sérum de lapin sont décomplémentés afin d'éliminer les protéines du complément, en les portant à une température de $56^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ pendant une durée de 30 à 45 min.

30

Le sérum de lapin est purifié pour la fraction d'immunoglobulines par une chromatographie sur une résine échangeuse d'anions (DEAE) à température ambiante suivie de deux précipitations au sulfate de sodium.

Après une nouvelle étape de filtration, de concentration et
5 diafiltration, les immunoglobulines anti-thymocytes sont pasteurisées à une température de 60°C pendant 10 heures afin d'en assurer la sécurité virale.

Selon une variante, on peut effectuer les étapes de filtration, concentration, diafiltration et précipitation de la fraction immunoglobuline (par exemple fractionnement alcoolique de type COHN ou sulfate d'ammonium)
10 avant l'étape de chromatographie.

La solution d'immunoglobulines peut, après formulation et stérilisation par filtration, être conservée à l'état liquide dans une solution de 5 à 25 mg/ml ou selon une variante à l'état lyophilisé. Une série de contrôles de qualité est exécutée incluant des tests physicochimiques, des tests de
15 sécurité (présence d'agents pyrogènes, d'activité antiplaquettaire), des testés de stérilité et de pureté ainsi que des tests d'activités lymphocytotoxiques (inhibition de formation de rosettes in vitro et survie de greffon de peau allogénique chez le singe).

20 **EXEMPLE 2 :**

Analyse comparative de l'efficacité et de l'innocuité des immunoglobulines obtenues par le procédé de l'invention vis-à-vis des immunoglobulines classiques (obtenues par hémadsorption).

25 **3.1 Mesure de l'activité spécifique *in vitro***

Deux lots d'immunoglobulines ont été utilisés pour l'étude comparative de l'activité spécifique : un lot d'immunoglobulines anti-thymocytes (ATG) standard et un lot d'ATG non hémadsorbées.

Pour déterminer l'activité spécifique des ATG, c'est-à-dire pour
30 évaluer la quantité d'immunoglobulines capables de se lier aux lymphocytes humains, on utilise une technique de cytométrie de flux couplée à une

immunofluorescence indirecte. Du sang total (contenant l'ensemble des cellules sanguines) de singe est incubé avec les lots d'ATG à différentes concentrations. L'excès d'immunoglobulines non fixées est rincé et un second anticorps marqué à l'isothiocyanate de fluorescence (FITC) est
5 ajouté pour venir se fixer sur les ATG liées. Ensuite, le taux de liaison des ATG à la surface des cellules est révélé après différenciation des cellules en fonction de leur taille grâce à la cytométrie de flux.

Les résultats montrent une plus grande activité spécifique des ATG non hémadsorbés. Ainsi, pour obtenir une même liaison aux lymphocytes, il
10 faut 2,73 µg/ml d'ATG non hémadsorbée quand il faut 7,23 µg/ml d'ATG standard, soit 2,65 fois plus. L'étape d'hémadsorption diminue donc la capacité de liaison et l'activité spécifique des ATG.

3.2 Mesure de l'activité des ATG *in vivo* dans le test de greffe cutanée chez le singe

15

Trois groupes de singes ont été sélectionnés pour effectuer ce test : un groupe contrôle (n=5), un groupe recevant 5 mg/kg d'ATG standard (n=8) et un groupe recevant 5 mg/kg d'ATG non hémadsorbé (n=3) initialement. Une dilution de moitié des ATG non hémadsorbés est réalisée afin d'obtenir
20 une activité spécifique équivalente à celle du lot standard.

Le test de greffe cutanée consiste à réaliser à J0 quatre allogreffes (provenant d'un animal dont au moins deux des déterminants antigéniques HLA sont différents) et une autogreffe de peau sur le dos de chaque animal. On administre ensuite *in vivo* les doses d'ATG pendant trois semaines à
25 partir de J-1.

Les résultats montrent que les durées de survie moyenne des allogreffes sont équivalentes pour les deux groupes de singes traités : 23 jours ($\pm 4,16$) pour le groupe ATG standard et 21,3 jours ($\pm 7,3$) pour le groupe ATG non hémadsorbé. Elles sont en outre supérieures au contrôle :
30 9,4 jours ($\pm 1,5$).

L'allongement de la durée de survie de greffe cutanée est corrélé à la déplétion lymphocytaire induite par l'administration d'ATG. La lymphopénie suit une évolution comparable entre les deux lots : baisse maximale du taux de lymphocytes à J5 puis retour progressif aux valeurs normales vers J20.

- 5 En conséquence, le lot dilué d'ATG non hémadsorbées est équivalent en terme d'efficacité *in vivo* chez le primate au lot d'ATG standard non dilué.

10 3.3 Evaluation des risques anémiques hémolytiques consécutifs à l'administration d'ATG.

Dans le cadre de la même étude, des dosages sanguins ont été effectués régulièrement jusqu'à la fin du test et ont montré que l'évolution du taux d'hémoglobuline est identique chez les deux groupes de singes traités. On observe une diminution de ce taux jusqu'à J9, jusqu'à ce que celui-ci revienne progressivement aux valeurs normales. Deux phénomènes sont à l'origine de cette évolution : premièrement, l'anémie est de type iatrogène, consécutive aux prélèvements sanguins répétés. Cette anémie est identique dans les trois groupes de singes. Deuxièmement, un effet propre des ATG provoque une diminution sensible du taux d'hémoglobuline dès J1 dans les groupes traités, cette diminution étant identique avec l'ATG standard ou avec l'ATG non hémadsorbé.

25 De plus, afin de déceler une éventuelle origine hémolytique de l'anémie, les taux d'haptoglobine et d'oromucoïde sont également mesurés. En cas d'hémolyse, l'haptoglobine devient indosable. Or, ces deux taux augmentent dès J4 pour les deux groupes, augmentation qui est le reflet d'une activité inflammatoire.

Ainsi, la sécurité hématologique évaluée chez les animaux traités avec l'ATG non hémadsorbée est aussi satisfaisante que chez les animaux traités avec l'ATG hémadsorbée.

REVENDICATIONS

1. Procédé de production d'immunoglobulines anti-thymocytes humains qui comprend les étapes consistant à :

- 5 (a) injecter une préparation cellulaire de thymocytes humains à un animal exempt d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) ;
(b) recueillir le sérum immun produit par l'animal ;
(c) isoler les immunoglobulines anti-thymocytes humains du sérum, sans adsorption sur du matériel biologique humain.

10

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel l'animal EOPS est un lapin.

3. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, dans
15 lequel l'étape d'isolement (c) met en œuvre une chromatographie échangeuse d'ions, de préférence sur colonne, et/ou une ou plusieurs précipitations.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans
20 lequel la préparation cellulaire de thymocytes humains utilisée dans l'étape (a) est constituée de cellules de lignées en culture.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel la préparation cellulaire de thymocytes humains utilisée dans l'étape
25 (a) est obtenue par purification de thymocytes humains frais.

6. Immunoglobulines anti-thymocytes humains isolées susceptibles d'être préparées par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

30

7. Utilisation des immunoglobulines selon la revendication 6 pour la fabrication d'un médicament destiné à diminuer la quantité de lymphocytes circulants du sang et des tissus lymphoïdes chez un patient humain.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 01/02972

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K16/00 A61K39/395 //C07K16/18

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BEAUFIGEAU M ET AL: "Seven-year experience with rabbit antithymocyte globulin after cardiac transplantation at the Montreal Heart Institute." TRANSPLANTATION PROCEEDINGS, vol. 29, no. 7A, November 1997 (1997-11), pages 10S-12S, XP001002862 Symposium on North American Experience with Rabbit Anti-Human Thymocyte Globulin;Mont Tremblant, Quebec, Canada; January 31, 1997 ISSN: 0041-1345 the whole document ----- -/--	6,7

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

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

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

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

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

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 January 2002

Date of mailing of the international search report

31/01/2002

Name and mailing address of the ISA

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

Authorized officer

Le Flao, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int: 1al Application No

PCT/FR 01/02972

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SKOPINSKA-ROZEWSKA E ET AL: "SEARCH FOR THE BEST SCHEDULE FOR PRODUCTION OF NONTXIC ANTI THYMOCYTE GLOBULIN" MATERIA MEDICA POLONA, vol. 13, no. 3, 1981, pages 187-194, XP001002872 ISSN: 0025-5246 the whole document ----	1-7
A	VERSCHOOR E J ET AL: "VACCINATION AGAINST FELINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS USING FIXED INFECTED CELLS" VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, AMSTERDAM, NL, vol. 46, no. 1/2, 1 May 1995 (1995-05-01), pages 139-149, XP000609769 ISSN: 0165-2427 the whole document ----	1-7
A	US 4 364 935 A (KUNG PATRICK C ET AL) 21 December 1982 (1982-12-21) claims 1-11 ----	1-7
P,X	PREVILLE X ET AL: "A quantitative flow cytometry assay for the preclinical testing and pharmacological monitoring of rabbit antilymphocyte globulins (rATG)" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 245, no. 1-2, 1 November 2000 (2000-11-01), pages 45-54, XP004218807 ISSN: 0022-1759 the whole document -----	6,7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/02972

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4364935	A	21-12-1982	AT 13317 T 15-06-1985
		AU 545223 B2	04-07-1985
		AU 6501280 A	11-06-1981
		CA 1183470 A1	05-03-1985
		DE 3070655 D1	20-06-1985
		DE 30815 T1	19-07-1984
		DK 517380 A ,B,	05-06-1981
		EP 0030815 A2	24-06-1981
		ES 497425 D0	16-12-1982
		ES 8303097 A1	01-05-1983
		FI 803757 A ,B,	05-06-1981
		FI 850061 A ,B,	07-01-1985
		GR 72923 A1	11-01-1984
		HK 24386 A	11-04-1986
		HR 940824 A1	30-06-1997
		IE 50725 B1	25-06-1986
		IL 61624 A	31-07-1984
		JP 1013988 A	18-01-1989
		JP 1059870 B	20-12-1989
		JP 1574453 C	20-08-1990
		JP 1009999 B	21-02-1989
		JP 1524869 C	12-10-1989
		JP 56095123 A	01-08-1981
		MY 51986 A	31-12-1986
		NO 803661 A ,B,	05-06-1981
		NZ 195647 A	06-07-1984
		PH 17510 A	07-09-1984
		PT 72146 A ,B	01-01-1981
		SG 7386 G	21-11-1986
		SI 8013067 A8	31-10-1997
		US 4784951 A	15-11-1988
		US 4806349 A	21-02-1989
		YU 306780 A1	30-04-1984
		ZA 8007567 A	28-07-1982

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den Internationale No

PCT/FR 01/02972

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C07K16/00 A61K39/395 //C07K16/18

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

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

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

CIB 7 C07K

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	BEAUFIGEAU M ET AL: "Seven-year experience with rabbit antithymocyte globulin after cardiac transplantation at the Montreal Heart Institute." TRANSPLANTATION PROCEEDINGS, vol. 29, no. 7A, novembre 1997 (1997-11), pages 10S-12S, XP001002862 Symposium on North American Experience with Rabbit Anti-Human Thymocyte Globulin; Mont Tremblant, Quebec, Canada; January 31, 1997 ISSN: 0041-1345 le document en entier ---- -/--	6,7



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

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

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

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

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

22 janvier 2002

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

31/01/2002

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

Office Européen des Brevets, P.B. 5318 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Le Flao, K

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Derr - Internationale No
PCT/FR 01/02972

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	SKOPINSKA-ROZEWSKA E ET AL: "SEARCH FOR THE BEST SCHEDULE FOR PRODUCTION OF NONTXIC ANTI THYMOCYTE GLOBULIN" MATERIA MEDICA POLONA, vol. 13, no. 3, 1981, pages 187-194, XP001002872 ISSN: 0025-5246 le document en entier ----	1-7
A	VERSCHOOR E J ET AL: "VACCINATION AGAINST FELINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS USING FIXED INFECTED CELLS" VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, AMSTERDAM, NL, vol. 46, no. 1/2, 1 mai 1995 (1995-05-01), pages 139-149, XP000609769 ISSN: 0165-2427 le document en entier ----	1-7
A	US 4 364 935 A (KUNG PATRICK C ET AL) 21 décembre 1982 (1982-12-21) revendications 1-11 ----	1-7
P,X	PREVILLE X ET AL: "A quantitative flow cytometry assay for the preclinical testing and pharmacological monitoring of rabbit antilymphocyte globulins (rATG)" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 245, no. 1-2, 1 novembre 2000 (2000-11-01), pages 45-54, XP004218807 ISSN: 0022-1759 le document en entier -----	6,7

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Der Internationale No

PCI/FR 01/02972

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 4364935 A	21-12-1982	AT 13317 T	15-06-1985
		AU 545223 B2	04-07-1985
		AU 6501280 A	11-06-1981
		CA 1183470 A1	05-03-1985
		DE 3070655 D1	20-06-1985
		DE 30815 T1	19-07-1984
		DK 517380 A ,B,	05-06-1981
		EP 0030815 A2	24-06-1981
		ES 497425 D0	16-12-1982
		ES 8303097 A1	01-05-1983
		FI 803757 A ,B,	05-06-1981
		FI 850061 A ,B,	07-01-1985
		GR 72923 A1	11-01-1984
		HK 24386 A	11-04-1986
		HR 940824 A1	30-06-1997
		IE 50725 B1	25-06-1986
		IL 61624 A	31-07-1984
		JP 1013988 A	18-01-1989
		JP 1059870 B	20-12-1989
		JP 1574453 C	20-08-1990
		JP 1009999 B	21-02-1989
		JP 1524869 C	12-10-1989
		JP 56095123 A	01-08-1981
		MY 51986 A	31-12-1986
		NO 803661 A ,B,	05-06-1981
		NZ 195647 A	06-07-1984
		PH 17510 A	07-09-1984
		PT 72146 A ,B	01-01-1981
		SG 7386 G	21-11-1986
		SI 8013067 A8	31-10-1997
		US 4784951 A	15-11-1988
		US 4806349 A	21-02-1989
		YU 306780 A1	30-04-1984
		ZA 8007567 A	28-07-1982