

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 899 112

②① N° d'enregistrement national : **06 02803**

⑤① Int Cl⁸ : **A 61 K 39/12** (2006.01)

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 31.03.06.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 05.10.07 Bulletin 07/40.

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

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *LABORATOIRE FRANCAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
Groupement d'intérêt public — FR.*

⑦② Inventeur(s) : SCHMITTHAEUSLER ROLAND.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET LEPEUDRY.

⑤④ **CONCENTRE D'IMMUNOGLOBULINES ET DE FRAGMENTS F (AB)'2 ET/OU FAB SPECIFIQUES D'UN
ARBOVIRUS EN TANT QUE MEDICAMENT.**

⑤⑦ L'invention concerne un nouveau médicament destiné
au traitement des arbovirus, à savoir un concentré d'immu-
noglobulines et de fragments F(ab)'2 et/ou Fab spécifiques
dudit arbovirus ainsi que son procédé de préparation.

FR 2 899 112 - A1



L'invention concerne un nouveau médicament destiné au traitement des arbovirus, à savoir un concentré d'immunoglobulines et de fragments F(ab)'₂ et/ou Fab spécifiques dudit arbovirus ainsi que son procédé de préparation.

Introduction

Les virus faisant intervenir dans leur cycle des arthropodes vecteurs sont regroupés sous le terme général d'arbovirus. Les arbovirus sont définis par l'OMS comme des virus qui subsistent dans la nature essentiellement ou en grande partie grâce à la transmission biologique entre hôtes vertébrés sensibles par des arthropodes hématophages ; ils se multiplient et provoquent une virémie chez le vertébré, prolifèrent dans les tissus de l'arthropode et sont transmis à un nouveau vertébré par l'arthropode piqueur après une période d'incubation extrinsèque.

La transmission du virus d'un hôte virémique à un moustique adulte femelle se fait par le sang aspiré lors de la piqûre. Le virus se multiplie dans le moustique, il traverse la frontière stomacale de l'animal et se retrouve dans ses glandes salivaires.

La contamination d'un homme sain est réalisée par la salive anti-coagulante de moustique libérée juste avant la piqûre dans un vaisseau sanguin. La fenêtre pendant laquelle une personne est un hôte virémique avant de devenir malade n'est que de quelques jours.

25

Les arbovirus connus appartiennent à cinq familles de virus :

- les Togaviridae, genre Alphavirus, 28 virus, dont les virus *Chikungunya*, *O'Nyong Nyong*, *Ross River*, *Sindbis*, *Mayaro*
- les Flaviviridae, genre *Flavivirus*, 68 virus, dont le virus de la fièvre jaune, des dengues, de l'encéphalite japonaise, le virus *West Nile*, les

- virus des encéphalites à tiques d'Eurasie tempérée, les virus de la maladie de la forêt de Kyasianur et de la fièvre hémorragique d'Omsk
- 5 - les Bunyaviridae, genre *Bunyavirus* (138 virus, dont le virus *Bunyamwera*), genre *Phlébovirus* (43 virus, dont le virus de la Fièvre de la Vallée du Rift), genre *Nairovirus* (24 virus, dont le virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo) + 41 virus non classés
 - 10 - les Reoviridae, genre *Orbivirus* (69 virus) et genre *Coltivirus* (2 virus) + 6 virus non classés
 - les Rhabdoviridae, genre *Vesiculovirus* (18 virus) et genre *Lyssavirus* (16 virus) + 36 virus non classés.

15

Les principales arboviroses observées sous les tropiques sont détaillées ci-après.

Les dengues sont répandues dans toutes les zones tropicales et subtropicales du monde et représentent

20 le premier problème de Santé Publique posé par les arboviroses. Il existe quatre sérotypes viraux dénommés « Dengue 1, 2, 3, 4 », n'entraînant pas une protection croisée. Cliniquement, on distingue plusieurs formes de dengue : la dengue asymptomatique,

25 la dengue classique (DC) et les formes graves, notamment hémorragiques, dengue hémorragique (DH) et dengue avec syndrome de choc (DSC), pouvant entraîner la mort, surtout chez l'enfant. Les 4 types de virus de la dengue peuvent être en cause dans les DC comme

30 dans les DH. On ignore les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la genèse des DH. La théorie la plus souvent retenue fait appel au phénomène de la « facilitation immunologique » : un sujet ayant été infecté par l'un des quatre sérotypes

35 n'étant pas protégé contre les trois autres, une seconde infection, hétérologue, pourrait se traduire par une DH. Les vecteurs sont des moustiques du genre *Aedes* : *Aedes aegypti* est le vecteur majeur, *Aedes*

albopictus joue un rôle important en zone rurale et péri-urbaine et supporte bien les climats tempérés.

Le virus West Nile est aujourd'hui considéré comme le plus répandu des flavivirus après le virus de la dengue ; il touche l'homme de façon sporadique ou épidémique. Il s'est récemment illustré en émergeant pour la première fois sur le continent américain, lors d'une épidémie survenue à New-York en 1999 (62 cas dont 7 décès). Il s'est ensuite considérablement répandu aux Etats-Unis, touchant plus de 9000 personnes dans 44 états en 2003 dont 2866 cas d'encéphalites et 264 décès. Le virus avait précédemment été trouvé dans diverses régions du globe, en Afrique, au Moyen-Orient, en Inde, et en Europe. Les moustiques sont les principaux vecteurs du virus West Nile, principalement ceux du genre *Culex*. Les hôtes principaux du virus sont les oiseaux, qu'ils soient sauvages ou domestiques (canards, pigeons...). Ils jouent un rôle crucial dans la dissémination du virus. Le virus West Nile infecte l'homme principalement par piqûre d'un moustique vecteur. L'infection se caractérise par la survenue brutale d'une fièvre importante après 3 à 6 jours d'incubation. Cette fièvre est accompagnée de maux de tête et de dos, de douleurs musculaires, d'une toux, d'un gonflement des ganglions du cou, et souvent d'une éruption cutanée, de nausées, de douleurs abdominales, de diarrhées et de symptômes respiratoires. Dans moins de 15% des cas, des complications surviennent : méningites, encéphalites, et rarement hépatite, pancréatite ou myocardite. Généralement, le malade récupère spontanément, parfois avec séquelles. Mais la maladie peut s'avérer fatale chez des personnes âgées, et parfois chez de jeunes enfants.

35

La fièvre jaune (FJ) demeure une endémie redoutable et une menace constante en Afrique Noire et en Amérique

intertropicale. Elle est due au *virus amaril*. Elle se présente comme une hépatonéphrite hémorragique, le typhus amaril, avec une phase de début ou phase rouge, une rémission au 3^e jour, une phase d'état ou phase
5 jaune avec ictère, vomissements, hémorragies principalement digestives, syndrome rénal. L'épidémiologie est complexe dans la mesure où, dans les milieux naturels, le virus amaril circule en permanence au sein des populations de singes, grâce à
10 des moustiques sauvages simiophiles servant de vecteurs. Ce n'est qu'accidentellement, lorsque l'homme vient à se trouver en contact avec un tel cycle selvatique, que se produisent les premiers cas humains.

15

Le chikungunya (en abrégé CHIK) est transmis par des moustiques du genre *Aedes*. Le nom est d'origine bantoue et signifie : *qui se recourbe, qui se recroqueville*, ou *maladie de l'homme courbé* car elle
20 occasionne de très fortes douleurs articulaires associées à une raideur, ce qui donne aux patients infectés une attitude courbée très caractéristique. Parmi plus de 950 espèces de moustiques, plusieurs d'entre elles sont susceptibles de transmettre le
25 chikungunya, mais seules *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* ont été à ce jour identifiées comme vecteurs épidémiques, à cause de leur adaptation aux zones d'habitat humain. Ces mêmes espèces sont également impliquées dans la transmission d'autres
30 arbovirus : dengue, fièvre dengue hémorragique (DHF), fièvre jaune, etc.

Le tableau clinique est dominé par une fièvre élevée comme celle de la dengue (dengue et chikungunya ont souvent été confondues) associée à des douleurs
35 articulaires invalidantes et parfois une éruption cutanée. Mais il y a des formes sévères ignorées jusque-là : des hépatites fulminantes, des attaques du muscle cardiaque, des méningo-encéphalites... De

nombreux autres arbovirus du genre alphavirus (capside d'environ 30kD et ARN polyadénylé en 3') comme Ross River, O'nyong-nyong, et Mayaro ont été associés à des symptômes similaires.

- 5 L'incubation de la maladie dure de quatre à sept jours en moyenne. La virémie, c'est-à-dire la période de présence du virus dans le sang et donc de transmission possible, s'étale sur environ cinq jours. Les anticorps se déclarent ensuite. Ils restent dans le
10 sang. L'immunité est donc normalement acquise à vie.

Un vaccin est disponible pour prévenir la fièvre jaune. La vaccination est systématique chez les populations exposées. Cependant, 60 à 80% de la
15 population doit être immunisée (naturellement ou après vaccination) pour éviter les épidémies. Les anticorps apparaissent au bout d'une dizaine de jours. La vaccination est contre-indiquée chez les femmes enceintes et les nourrissons de moins de 6 mois.

- 20 Un vaccin est également utilisé en Europe contre l'encéphalite à tiques. Il est commercialisé sous le nom de TICOVAC® (Baxter SA).

Une phase I et une phase II ont été menées aux Etats-Unis pour un vaccin anti-chikungunya par le United
25 States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (Edelman R et al. "Phase II safety and immunogenicity study of live chikungunya virus vaccine" TSI-GSD-218. Juin 2000; Am J Trop Med Hyg, 62:681-5).

- 30 Il n'existe pour l'instant aucun traitement virucide contre les arbovirus.

Le traitement est purement symptomatique pour faire tomber la fièvre et réduire la douleur.

35 Art antérieur

Plusieurs études ont montré l'efficacité des injections d'immunoglobulines contenant des anticorps

anti-hépatite A à des sujets risquant d'être exposés à ce virus, avant la mise au point d'un vaccin anti-hépatite A (Ohara et al., Jpn J Exp Med, 1986 Oct ; 56(5) :229-33 ; Conrad ME et al., J Infect Dis, 1987 Jul ; 156(1) :56-63).

Les immunoglobulines spécifiques de l'hépatite B ou anti-HBs sont largement utilisées pour protéger toute personne non vaccinée se blessant avec du matériel souillé, le nouveau-né de mère antigène HBs positif et dans ce cas l'injection doit être pratiquée immédiatement après la naissance et doit être accompagnée de la mise en route d'une vaccination, le patient transplanté hépatique pour éviter la réinfection du greffon et le partenaire sexuel d'un sujet antigène HBs positif en attendant l'efficacité de la vaccination. Elles réalisent une protection, soit avant l'exposition au risque, soit dans les 24 h qui suivent le contact infectant (piqûre accidentelle).

20

Résumé de l'invention

Devant une telle absence de traitement virucide établi et un seul vaccin ayant reçu une autorisation de mise sur le marché, le Demandeur a cherché à mettre au point un médicament pour traiter ou prévenir les arboviroses à base d'immunoglobulines spécifiques permettant d'immuniser rapidement les personnes exposées.

Le Demandeur a montré de façon surprenante qu'un tel traitement nécessite l'association d'immunoglobulines et de fragments F(ab)'₂ et/ou Fab spécifiques de l'arbovirus à traiter pour être efficace.

Définitions

On appelle « concentré » un produit obtenu par élimination de certains constituants. Un concentré

d'immunoglobulines est obtenu par élimination de certains constituants du plasma pour aller vers une fraction plasmatique enrichie en immunoglobulines.

On appelle « immunoglobuline » une globuline naturelle
5 présente surtout dans le plasma, ayant des fonctions d'anticorps et utilisable à titre curatif ou préventif.

Les immunoglobulines sont des hétérodimères constitués de 2 chaînes lourdes et de 2 chaînes légères, liées
10 entre elles par des ponts disulfures. Chaque chaîne est constituée, en position N-terminale, d'une région ou domaine variable (codée par les gènes réarrangés V-J pour la chaîne légère et V-D-J pour la chaîne
15 lourde) spécifique de l'antigène contre lequel l'anticorps est dirigé, et en position C-terminale, d'une région constante, constituée d'un seul domaine CL pour la chaîne légère ou de 3 domaines (CH1, CH2 et CH3) pour la chaîne lourde. L'association des domaines
20 variables et des domaines CH₁ et CL des chaînes lourdes et légères forme les parties Fab, qui sont connectées à la région Fc par une région charnière très flexible permettant à chaque Fab de se fixer à sa cible
antigénique tandis que la région Fc, médiatrice des propriétés effectrices de l'anticorps, reste
25 accessible aux molécules effectrices telles que les récepteurs FcγR et le C1q.

Les IgG sont les immunoglobulines les plus abondantes (75 à 80 % des anticorps circulants). Elles protègent
30 l'organisme contre les bactéries, les virus, et les toxines qui circulent dans le sang et la lymphe. D'autre part, elles fixent rapidement le complément (un des constituants du système immunitaire). Elles participent également à la réponse mémoire, base de
35 l'immunité sur laquelle repose le mécanisme de la vaccination. Enfin, les immunoglobulines G traversent

le placenta et, de ce fait, entraînent une immunité passive chez le fœtus.

Les IgA se trouvent essentiellement dans les
5 sécrétions comme la salive, le suc intestinal, la sueur et le lait maternel. Le rôle essentiel des immunoglobulines A est d'empêcher les agents pathogènes de se lier à la cellule et plus spécifiquement aux cellules de recouvrement
10 constituant les muqueuses et l'épiderme.

Les IgM sont des immunoglobulines sécrétées lors du premier contact de l'organisme avec un antigène. C'est la première classe d'immunoglobulines libérée par les
15 plasmocytes. La présence d'IgM dans le sang indique une infection en cours.

La protéolyse enzymatique des immunoglobulines par la papaine génère 2 fragments identiques, qu'on appelle
20 « fragment Fab » (Fragment Antigen Binding), et un fragment Fc (fraction cristallisable). Le fragment Fc est le support des fonctions effectrices des immunoglobulines.

Par protéolyse à la pepsine, un fragment $F(ab')_2$ est
25 généré, où les deux fragments Fab restent liés par deux ponts disulfure, et le fragment Fc est scindé en plusieurs peptides. Le fragment $F(ab')_2$ est formé de deux fragments Fab' (un fragment Fab' consistant en un Fab et une région charnière), liés par des ponts
30 disulfure intercaténaires pour former un $F(ab')_2$.

On appelle « chromatographie » une méthode de séparation des constituants d'un mélange fondée sur leur adsorption sélective par un support approprié.

35 Description détaillée de l'invention

En premier lieu, l'invention concerne un concentré d'immunoglobulines et de fragments F(ab)'₂ et/ou Fab spécifiques d'un arbovirus en tant que médicament.

- 5 L'utilisation de fractions de plasma humain enrichies en immunoglobulines pour le traitement de diverses infections ou déficiences congénitales est connue depuis la mise au point du procédé de précipitation à l'éthanol par Cohn (Cohn et al. 1946, J. Am. Chem. Soc. 68, 459 ; Oncley et al. 1949, J. Am. Chem. Soc. 71, 541).

De tels fragments F(ab)'₂ ou Fab, qui contiennent le site de liaison de l'anticorps, peuvent avoir perdu un certain nombre de propriétés de l'anticorps entier
15 duquel ils sont issus, comme la capacité de lier les récepteurs Fcγ.

L'arbovirus en question susceptible d'être traité par un concentré selon l'invention peut être, par exemple, un des virus de la dengue, le virus de la fièvre
20 jaune, le virus West Nile, le virus chikungunya, le virus Ross River, le virus O'nyong-nyong ou le virus Mayaro.

Dans le concentré selon l'invention, toutes les combinaisons sont possibles entre un mélange
25 d'immunoglobulines A, G et/ou M et des fragments F(ab)'₂ et/ou Fab d'Ig A, G et/ou M spécifiques d'un arbovirus.

En particulier, le concentré selon l'invention est un concentré d'immunoglobulines A, G, et M et de
30 fragments F(ab)'₂ et/ou Fab spécifiques d'un arbovirus.

De préférence, le concentré selon l'invention est un concentré d'immunoglobulines G exclusivement ou un concentré d'immunoglobulines M exclusivement, et de
35 fragments F(ab)'₂ et/ou Fab spécifiques d'un arbovirus
De manière particulièrement préférée, le concentré selon l'invention est constitué d'un concentré

d'immunoglobulines G exclusivement et de fragments F(ab)'₂ et/ou Fab d'IgG et d'IgM spécifiques d'un arbovirus.

De préférence, le concentré selon l'invention contient
5 90 à 98% d'immunoglobulines et de F(ab)'₂ et/ou Fab, en particulier 5 à 50% de F(ab)'₂ et/ou Fab, en particulier au moins 50 à 60 g/L d'Ig et de fragments pour une préparation pharmaceutique.

Le concentré selon l'invention peut être additionné de
10 1 à 10 mmol de magnésium et/ou de zinc.

Un autre objet de l'invention est l'utilisation d'un concentré selon l'invention, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement dudit arbovirus.

Ce traitement est prophylactique ou curatif. Il permet
15 soit de transférer une immunité passive chez les personnes non encore touchées dans une région épidémique, soit de soigner les patients déjà touchés par le virus.

Le médicament en question est administré par voie
20 topique, orale, intramusculaire ou intraveineuse.

Son efficacité est de plusieurs dizaines de jours, environ 21 jours, et au-delà l'administration doit être répétée si l'épidémie ou les symptômes persistent.

25 L'invention concerne également un procédé de préparation d'un concentré selon l'invention.

Ce procédé consiste à mélanger un concentré d'immunoglobulines spécifiques d'un arbovirus et un concentré d'immunoglobulines ayant subi une protéolyse
30 afin d'obtenir des fragments F(ab)'₂ et Fab spécifiques du même arbovirus. Ce procédé nécessite donc la préparation d'au moins un concentré d'immunoglobulines.

Ce procédé débute par la constitution d'un lot d'au
35 moins 1000 dons de plasma, chaque don présentant un titre suffisant en Ig dirigées contre ledit arbovirus. Ces dons proviennent de personnes ayant été en contact avec la maladie, voire de patients ayant développé la

maladie.

Le titrage peut être effectué selon C. van de Water et al., Journal of Immunological Methods, 166(1993), 157-164.

- 5 Afin d'enrichir ce lot de plasma en immunoglobulines, les autres constituants du plasma, appelés « contaminants lipidiques et protéiques » sont précipités en une seule étape. Cette purification par précipitation en une seule étape peut avoir lieu en
- 10 diluant le plasma dans les conditions de la précipitation selon Steinbuch (Steinbuch M., Archiv. Biochem. Biophys., 134, 279-284) par l'acide caprylique et en y ajoutant de l'acide caprylique. Elle peut également avoir lieu par des agents de
- 15 précipitation tels que le Rivanol, le chlorure d'Aluminium, le chlorure de cétypyridinium, l'acide octanoïque, les polyphosphates et en présence d'agents d'adsorption tels que le phosphate tricalcique, la bentonite.
- 20 Le surnageant peut constituer un concentré d'immunoglobulines. Il contient alors un mélange d'IgG, A et M. Il est récupéré, par exemple par filtration, éventuellement en ajoutant au moins un adjuvant de filtration.
- 25 Le surnageant peut subir un traitement d'inactivation virale classique par solvant/détergent (Triton X100). Si la précipitation était une précipitation caprylique, les résidus d'acide caprylique dans le surnageant sont éliminés par PO4 calcium.
- 30 Afin d'obtenir un concentré d'IgG ou d'IgA ou d'IgM, l'enseignement du brevet EP02727688.0 peut être appliqué. Le surnageant subit alors une étape supplémentaire de purification par chromatographie sur un échangeur d'anions effectuée à pH alcalin. En
- 35 particulier, le pH du surnageant est préalablement ajusté à un pH entre 8,9 et 9,1 et la colonne est équilibrée en tampon à pH 8,9 à 9,1. L'étape de chromatographie permet l'adsorption des

- immunoglobulines et le passage des protéines non adsorbées dans l'effluent. La chromatographie peut être effectuée sur un gel de polysaccharide réticulé ou de polymère vinylique, greffé de groupements DEAE, TMAE ou QAE.
- Après un lavage de la colonne avec le même tampon que le tampon d'équilibrage pour éliminer les protéines non adsorbées, les immunoglobulines G sont éluées par du tampon phosphate à pH compris entre 4 et 7, de préférence à pH 6,2.
- Une élution subséquente éventuelle par le même tampon phosphate additionné de NaCl 100 à 175 mM, de préférence 150 mM, à un pH de 6 à 6,3, permet de recueillir les IgA.
- Une élution subséquente éventuelle par le même tampon ajusté à un pH de 6 à 7 et additionné de NaCl 250 à 350 mM, de préférence 300 mM permet d'éluer les IgM.
- Tout type de mélange entre les IgA, les IgG et les IgM peut être envisagé en mélangeant les concentrés tels que décrits ci-dessus.
- Les immunoglobulines ainsi éluées et récoltées peuvent être concentrées par ultrafiltration et soumises à une filtration stérilisante conventionnelle puis à une filtration au travers de filtres nanométriques de porosité décroissante de 100 à 15 nanomètres.
- La solution d'immunoglobulines concentrée et filtrée est additionnée d'un stabilisant pharmaceutiquement acceptable puis elle est conditionnée à l'état de solution stérile et éventuellement congelée et lyophilisée.
- L'application d'une nanofiltration permet d'éliminer des virus résistants au traitement par solvant-détergent.
- Une partie du concentré d'immunoglobulines ainsi obtenu, ou bien un autre concentré d'immunoglobulines obtenu de la façon décrite précédemment, est digéré pour obtenir des fragments F(ab)'₂ ou Fab. Les concentrés d'Ig et de fragments sont alors mélangés.

- 13 -

Ainsi, on obtient un concentré d'IgG et de F(ab)'₂ et/ou Fab d'IgG et d'IgM en :

- (1) préparant un concentré d'IgG de la façon décrite précédemment,
- 5 (2) préparant un concentré d'IgM de la façon décrite précédemment,
- (3) mélangeant et digérant une partie du concentré d'IgG et une partie du concentré d'IgM pour obtenir un mélange de fragments F(ab)'₂ et/ou de
10 Fab d'IgG et d'IgM,
- (4) mélangeant (1) et (3).

Pour obtenir des fragments F(ab)'₂, la protéolyse a lieu en pepsine 1% en poids de protéines à pH 4 et 35°C (protocole IGLOO).

- 15 Pour obtenir des fragments Fab, la protéolyse a lieu en papaine.

REVENDICATIONS

1. Concentré d'immunoglobulines et de fragments F(ab)'₂ et/ou Fab spécifiques d'un arbovirus en tant que médicament.
2. Concentré selon la revendication 1,
5 caractérisé en ce que ledit arbovirus est un des virus de la dengue, le virus de la fièvre jaune, le virus West Nile, le virus chikungunya, le virus Ross River, le virus O'nyong-nyong ou le virus Mayaro.
3. Concentré selon la revendication 1
10 ou 2, caractérisé en ce que les immunoglobulines sont des immunoglobulines A, G, et M.
4. Concentré selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que les immunoglobulines sont des immunoglobulines G.
5. Concentré selon la revendication 1
15 ou 2, caractérisé en ce que les immunoglobulines sont des immunoglobulines M.
6. Concentré selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il contient
20 90 à 98% d'immunoglobulines et de F(ab)'₂ et/ou Fab.
7. Concentré selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il contient 5 à 50% de F(ab)'₂ et/ou Fab.
8. Concentré selon l'une quelconque des
25 revendications 1 à 7, caractérisé en ce que les fragments F(ab)'₂ et/ou Fab sont des fragments F(ab)'₂ et/ou Fab d'IgG et/ou d'IgM.
9. Concentré selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, additionné de 1 à 10 mmol de
30 magnésium.
10. Concentré selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, additionné de 1 à 10 mmol de zinc.
11. Utilisation d'un concentré tel que
35 défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 10, pour la fabrication d'un médicament destiné au

traitement dudit arbovirus.

12. Utilisation selon la revendication 11, pour la fabrication d'un médicament sous forme administrable par voie topique, sous-cutanée, orale, 5 intramusculaire ou intraveineuse.

13. Procédé de préparation d'un concentré selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé par les étapes suivantes :

- 10 - constitution d'un lot d'au moins 1000 dons de plasma, chaque don présentant un titre suffisant en Ig dirigées contre ledit arbovirus
- précipitation des contaminants lipidiques et protéiques en une seule étape
- récupération du concentré d'Ig dans le surnageant 15 (1)
- protéolyse d'une partie du concentré précédent pour obtenir des fragments F(ab)'2 et/ou Fab (2),
- mélange des fractions (1) et (2).

14. Procédé de préparation d'un 20 concentré selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé par les étapes suivantes :

- constitution d'un lot d'au moins 1000 dons de plasma, chaque don présentant un titre suffisant en IgG anti-chikungunya
- 25 - précipitation des contaminants lipidiques et protéiques en une seule étape
- chromatographie du surnageant sur un échangeur d'anions à pH alcalin
- élution des IgG par du tampon phosphate à pH compris 30 entre 4 et 7 pour obtenir un concentré d'IgG (1)
- éventuellement élution subséquente des IgA par le même tampon phosphate additionné de NaCl 100 à 175 mM, et de préférence 150 mM, à un pH de 6 à 6,3 (1)
- éventuellement élution subséquente des IgM par le 35 même tampon phosphate à pH compris entre 6 et 7 additionné de NaCl 250 à 350 mM (1)
- éventuellement mélange des concentrés d'IgG, d'IgA et d'IgM (1)

- protéolyse d'une partie du concentré précédent pour obtenir des fragments F(ab)'2 et/ou Fab (2),
- mélange d'une fraction (1) et de la fraction (2).

5 15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que le pH du surnageant est ajusté entre 8,9 et 9,1 et la colonne de chromatographie est équilibrée en tampon à pH 8,9 à 9,1 préalablement à la chromatographie.

10 16. Procédé de préparation d'un concentré selon les revendications 4 et 8, caractérisé par les étapes suivantes :

- (1) préparation d'un concentré d'IgG selon la revendication 14 ou 15,
- 15 (2) préparation d'un concentré d'IgM selon la revendication 14 ou 15,
- (3) mélange et protéolyse d'une partie du concentré d'IgG et d'une partie du concentré d'IgM pour obtenir un mélange de fragments F(ab)'2 et/ou de
- 20 Fab d'IgG et d'IgM,
- (4) mélange de (1) et (3).

25 17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 13 à 16, caractérisé en ce que la protéolyse pour obtenir des fragments F(ab)'2 a lieu en pepsine 1% en poids de protéines à pH 4 et 35°C.

 18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 13 à 17, caractérisé en ce que la protéolyse pour obtenir des fragments Fab a lieu en papaine.

30 19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 13 à 18, caractérisé en ce que la précipitation est une précipitation caprylique et en ce que les résidus d'acide caprylique dans le surnageant sont éliminés par PO4 calcium.

35 20. Procédé selon l'une quelconque des revendications 13 à 19, caractérisé en ce que le précipité est séparé par filtration après ajout d'au moins un adjuvant de filtration.

21. Procédé selon l'une quelconque des revendications 13 à 20, caractérisé en ce que le surnageant est traité par solvant/détergent.

22. Procédé selon l'une quelconque des
5 revendications 13 à 21, caractérisé en ce que les immunoglobulines éluées sont concentrées par ultrafiltration et soumises à une filtration stérilisante conventionnelle puis à une filtration au travers de filtres nanométriques de porosité
10 décroissante de 100 à 15 nanomètres.

23. Procédé selon l'une quelconque des revendications 13 à 22, caractérisé en ce que la solution d'immunoglobulines concentrée et filtrée est additionnée d'un stabilisant pharmaceutiquement
15 acceptable puis elle est conditionnée à l'état de solution stérile et éventuellement congelée et lyophilisée.



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 677871
FR 0602803

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	SHIMONI Z ET AL: "TREATMENT OF WEST NILE VIRUS ENCEPHALITIS WITH INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULIN" EMERGING INFECTIOUS DISEASES, EID, ATLANTA, GA, US, vol. 7, no. 4, juillet 2001 (2001-07), page 759, XP009069707 ISSN: 1080-6040 * le document en entier *	1-23	
X	HAMDAN A ET AL: "POSSIBLE BENEFIT OF INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULIN THERAPY IN A LUNG TRANSPLANT RECIPIENT WITH WEST NILE VIRUS ENCEPHALITIS" TRANSPLANT INFECTIOUS DISEASE, MUNKSGAARD, COPENHAGEN, DK, vol. 4, no. 3, septembre 2002 (2002-09), pages 160-162, XP009069702 ISSN: 1398-2273 * abrégé *	1-23	
X	BEN-NATHAN D ET AL: "PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC EFFICACY OF HUMAN INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULIN IN TREATING WEST NILE VIRUS INFECTION IN MICE" JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, CHICAGO, IL, US, vol. 188, no. 1, 1 juillet 2003 (2003-07-01), pages 5-12, XP009069705 ISSN: 0022-1899 * le document en entier *	1-23	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
			A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
30 novembre 2006		Le Flao, Katell	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 677871
FR 0602803

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	AGRAWAL AMY GUILLET ET AL: "Human immunoglobulin as a treatment for West Nile virus infection" JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, CHICAGO, IL, US, vol. 188, no. 1, 1 juillet 2003 (2003-07-01), pages 1-4, XP002335078 ISSN: 0022-1899 * le document en entier * -----	1-23	
X	BAYRY JAGADEESH ET AL: "Intravenous immunoglobulin for infectious diseases: tailor-made or universal?" THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES. 15 NOV 2003, vol. 188, no. 10, 15 novembre 2003 (2003-11-15), pages 1610; author reply 1610-1611, XP002409713 ISSN: 0022-1899 * le document en entier * -----	1-23	
X	KREIL T R ET AL: "Pre- and postexposure protection by passive immunoglobulin but no enhancement of infection with a flavivirus in a mouse model." JOURNAL OF VIROLOGY. APR 1997, vol. 71, no. 4, avril 1997 (1997-04), pages 2921-2927, XP002409714 ISSN: 0022-538X * le document en entier * ----- -/-	1-12	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
30 novembre 2006		Le Flao, Katell	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 677871
FR 0602803

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	KUNISHIGE M ET AL: "Preferential gray matter involvement in dengue myelitis." NEUROLOGY. 23 NOV 2004, vol. 63, no. 10, 23 novembre 2004 (2004-11-23), pages 1980-1981, XP002409715 ISSN: 1526-632X * le document en entier * -----	1-23	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
30 novembre 2006		Le Flao, Katell	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			