

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 03.12.91.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 04.06.93 Bulletin 93/22.

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

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *FONDATION NATIONALE DE
TRANSFUSION SANGUINE — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : Basuyaux Bertrand, Batard Thierry et
Laroze Alain.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Cabinet Regimbeau Martin Schrimpf
Warcoin Ahner.

⑤4 Anticorps anti-allergènes, procédé de purification de ces anticorps et composition pharmaceutique les
contenant.

⑤7 La présente invention concerne des anticorps purifiés
dirigés spécifiquement contre des allergènes caractérisés
en ce qu'ils sont obtenus à partir de liquides biologiques,
ayant subi une chromatographie d'affinité sur des antigè-
nes spécifiques immobilisés et qu'ils présentent une acti-
vité biologique anti-allergénique.

Elle concerne également un procédé de purification de
ces anticorps et une composition pharmaceutique les
contenant.

FR 2 684 384 - A1



La présente invention se rapporte à une composition anti-allergique, comportant des immunoglobulines purifiées spécifiquement dirigées contre les constituants d'un extrait brut aqueux de pollen de graminées, en particulier de dactyle (*dactylis glomerata*).

- 5 En Europe occidentale, environ 15% de la population sont atteints d'allergie de type I (ou hypersensibilité immédiate), la moitié souffrant d'une allergie au pollen de graminées. Les espèces de graminées impliquées sont essentiellement les herbacées (par opposition aux céréales) dont le dactyle (*dactylis glomerata*), en France, est la plus allergénique. Les symptômes vont de la rhinite allergique saisonnière (rhume des foins) à l'asthme
10 bronchique, jusqu'au choc anaphylactique (pouvant être mortel).

- Le mécanisme de l'allergie met en jeu l'interaction du système immunitaire avec le système inflammatoire. Lors d'un premier contact avec les grains de pollen, ceux-ci pénètrent dans les voies respiratoires et libèrent leurs antigènes au contact des
15 muqueuses, dont les sécrétions sont essentiellement aqueuses. L'organisme va alors synthétiser des immunoglobulines de classe E (ou IgE) dirigées spécifiquement contre certains de ces antigènes, alors appelés allergènes. Ces IgE vont se fixer sur les mastocytes (tissulaires) et les basophiles (circulants) qui possèdent des récepteurs membranaires pour la partie constante (ou Fc) des immunoglobulines de classe E. Lors
20 de contacts subséquents de l'organisme avec les allergènes de pollen, ces derniers étant reconnus par les IgE fixées aux mastocytes et basophiles vont réaliser des pontages entre ces immunoglobulines. Ces pontages induisent la libération de médiateurs chimiques contenus par les mastocytes et basophiles, principalement l'histamine, suite à une cascade de réactions biochimiques complexes. L'histamine entraîne alors une hyperperméabilité
25 vasculaire suivie d'une extravasation de constituants sanguins (cas de la rhinite allergique), voire une hypersécrétion de mucus dans les poumons avec bronchoconstriction (cas de l'asthme bronchique).

- Pour enrayer les symptômes de l'allergie, certains traitements qui agissent sur le système
30 inflammatoire ou sur le système respiratoire sont efficaces ; il s'agit des anti-histaminiques et des corticoïdes (action sur le système inflammatoire), ou des bronchodilatateurs (action sur le système respiratoire). Mais ces traitements, s'ils ont un effet bien démontré sur les symptômes, ne soignent pas la maladie allergique elle-même. Dans cette voie, un traitement au niveau du système immunitaire semble plus prometteur.

Par ailleurs, les traitements de désensibilisation par injections intramusculaires d'allergènes n'ont fait état d'aucune efficacité sérieuse ; toutefois, ils ont permis de mettre en évidence le rôle des immunoglobulines de la sous-classe G₄ (ou Ig G₄) dans un éventuel pouvoir anti-allergique.

5

Précisément, l'injection d'immunoglobulines semble être une solution d'avenir. L'injection d'immunoglobulines sans spécificité particulière à des malades allergiques au pollen de graminées, avant et au tout début de la saison pollinique, entraîne une diminution des symptômes allergiques et de la prise d'anti-histaminiques lors de la saison pollinique, par rapport à un groupe de contrôle (J.P. GIRARD et al. 1988. Clin. Allergy 18 : 393-400).

A des malades souffrant de la même allergie ont été injectés des complexes immuns, formés par l'association d'allergènes de pollen de graminées avec des immunoglobulines purifiées spécifiquement dirigées contre ces allergènes. Pour chacun de ces malades, les immunoglobulines en question ont été purifiées à partir de son propre plasma (immunoglobulines autologues) après élimination des immunoglobulines de classe M (IgM). Si cet essai clinique a conduit à une amélioration durable de la maladie chez les patients traités (J.J. MACHIELS et al. 1990. Clin. Exp. Allergy 20 : 653-660), son application à une grande échelle semble peu envisageable, pour des raisons pratiques (purification d'un lot d'immunoglobulines différent pour chaque malade) et de coût (réalisation d'une colonne de purification différente pour chaque malade, en raison de possibles contaminations).

La présente invention a précisément pour but de pallier ces inconvénients ; elle consiste à purifier des immunoglobulines dirigées spécifiquement contre les antigènes de pollen de graminées, lesquelles sont obtenues à partir d'un pool de plasmas de donneurs volontaires naturellement immunisés.

Une telle préparation présenterait de nombreux avantages ; tout d'abord, une telle préparation pourrait être disponible sous une forme lyophilisée, appropriée à une longue conservation.

L'administration de cette préparation par voie intraveineuse permettrait l'injection de quantités importantes en produit actif avec une perte limitée dans l'organisme. Une forme nébulisable pourrait également être envisagée, fort appropriée à un traitement local des voies respiratoires, sites de manifestation des symptômes.

La présente invention permet précisément de mettre en oeuvre ces objectifs. Elle consiste à préparer des compositions riches en immunoglobulines spécifiques pour des utilisations thérapeutiques ou prophylactiques, en vue non seulement d'éliminer les symptômes allergiques lors de la saison pollinique mais aussi de soigner la maladie elle-même, en intervenant au
5 niveau du système immunitaire.

La mise en oeuvre de cette invention consiste à pratiquer une chromatographie d'affinité qui met en oeuvre une immobilisation des antigènes hydrosolubles de pollen de dactyle sur un support d'immuno-affinité. Les
10 milieux contenant ces immunoglobulines sont des liquides biologiques qui peuvent être de source variée, mais plus particulièrement des plasmas ou sérums humains ou animaux.

De préférence, les antigènes immobilisés sur le support proviennent d'un extrait hydrosoluble d'allergènes de pollen de dactyle, mais des extraits
15 hydrosolubles d'allergènes de pollen d'autres graminées (Phléole, Fétuque, Ray-grass...) peuvent parfaitement convenir puisque les allergènes majeurs sont communs à toutes les graminées.

De manière préférée, la résine utilisée porte des fonctions carboxyles et les antigènes sont liés au support par leur fonction amine.

20 Une technique de couplage d'antigènes de pollen sur un support a certes déjà été décrite (J.J. MACHIELS et al. Voir plus haut). Toutefois, elle ne concerne pas les constituants hydrosolubles de pollen de dactyle, elle comprend l'élimination des IgM contenues dans le milieu à purifier (ces IgM pouvant être le support d'un éventuel pouvoir anti-allergique) avant
25 l'immunopurification elle-même, et montre une capacité très faible, d'où son caractère inadapté à une production d'immunoglobulines à grande échelle.

L'originalité de la technique utilisée selon la présente invention et décrite plus en détail ci-après permet, elle, d'obtenir de manière efficace et en
30 une seule étape un mélange d'IgG, IgM, IgA et IgE, dirigés contre les antigènes hydrosolubles de pollen.

Après la chromatographie, l'activité spécifique anti-pollen du mélange est 1000 à 10000 fois plus importante que le liquide biologique de départ, cela tient au fait que chacune des classes des immunoglobulines du mélange
35 présente une activité biologique in vitro, comme nous le démontrons dans les exemples.

Le caractère surprenant de cette activité anti-pollen importante tient à deux facteurs :

- Le premier est que chaque sous-classe d'immunoglobuline a une activité, alors que, dans la littérature scientifique, il était admis que seules les IgE et sous-classe 4 des IgG (IgG4) avait un effet anti-allergène.
- Le deuxième facteur surprenant est que, dans les différentes classes d'immunoglobulines, sont efficaces aussi bien les anticorps primaires, dirigés contre les allergènes, que les anticorps secondaires dirigés contre la partie constante Fc des IgE ce qui conduit à une inhibition de la dégranulation des basophiles par les •IgE.

Compte tenu de leur pureté protéique, qui peut être supérieure ou égale à 50 %, les anticorps anti-pollen, objets de la présente invention peuvent être administrés à l'homme, seuls ou en combinaison avec un autre composé dans une composition pharmaceutique. Ils sont tout particulièrement utiles dans la prévention ou le traitement des symptômes liés à l'allergie au pollen de graminées.

Ces compositions peuvent être destinées à une administration générale par voie systémique, ou locale sous forme nébulisable adaptée aux voies respiratoires.

La présente invention se rapporte également aux compositions pharmaceutiques contenant au moins à titre de principe actif, des anticorps anti-pollen selon l'invention.

Les exemples et figures donnés ci-après à titre non limitatif, permettent de démontrer les caractéristiques du produit et de mettre en évidence d'autres caractéristiques et avantages de la présente invention.

- Figure 1 : Inhibition de la libération d'histamine par une fraction immunopurifiée à partir de plasmas riches en IgG4 anti-pollen.
- Figure 2 : Inhibition de la libération d'histamine par une fraction immunopurifiée à partir de plasmas non présélectionnés.
- Figure 3 : Activité in vitro des fractions de la chromatographie sur Anti-IgE immobilisés.

Exemple 1 : purification par chromatographie d'immuno-affinité d'anticorps anti-pollen

1) MATERIEL ET METHODES

5 1.1 Préparation du support

a) Extraction des allergènes du pollen

10 753 mg de pollen de dactyle (Institut Pasteur, France) sont mis en incubation dans 15 ml d'eau distillée sous agitation pendant 1 heure à température ambiante. Après centrifugation 5 minutes à 9000 g, le surnageant est récupéré puis filtré sur filtre Minisart 5 μm puis 0,22 μm (Sartorius) : 14 ml à 5 mg de protéines par ml sont ainsi récupérés (la concentration est évaluée à l'aide du dosage par BCA, kit PIERCE) soit 15 70 mg de protéines.

b) Préparation du gel

20 Parallèlement 6 g de gel sec BrCN-sépharose (Pharmacia) sont mis en suspension durant 15 minutes dans 1 litre d'une solution d'HCl 10^{-3} M. Puis le gel est essoré sur verre fritté. Le gel est ensuite lavé avec 50 ml de tampon de couplage (tampon NaH CO₃ 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH = 8,3) puis essoré sur verre fritté.

25 c) Couplage des allergènes

30 Dans une éprouvette de 50 ml permettant une fermeture hermétique, le gel puis les 14 ml d'allergènes et enfin 14 ml de tampon de couplage sont introduits successivement. L'éprouvette est fermée hermétiquement puis mise sous agitation (agitateur rotatif).; la réaction de couplage s'effectue 16 heures à +4°C.

35 Le gel est ensuite essoré et lavé sur verre fritté avec 20 et 60 ml de tampon de couplage. Chaque filtrat est soigneusement récupéré : leur volume est précisé et leur concentration en protéines mesurée à l'aide du dosage par BCA (kit PIERCE). Ainsi, le rendement de couplage peut être déterminé = 48% (soit 2,8 mg de protéines par ml de gel).

Puis le gel est introduit dans une nouvelle éprouvette de 50 ml et 25 ml d'une solution d'éthanolamine 1 M pH8 sont ajoutés. Les sites actifs résiduels non couplés aux allergènes sont ainsi saturés ; la réaction est réalisée 2 heures à température ambiante.

5 Le gel est essoré sur verre fritté et subit 5 séries successives de lavage ; chaque série est réalisée avec 50 ml de deux tampons : tampon acétate de sodium 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8.

10 Le gel est ensuite essoré sur verre fritté puis lavé successivement avec 50 ml de tampon citrate/glycine 0,1 M pH 2,5 et 50 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7,5.

1.2 Essai d'immunopurification

a) Chromatographie

15

L'essai a été réalisé sur une colonne IBF 50 contenant 25 ml de gel susmentionné. Outre la colonne, le système chromatographique se compose de :

20

- . une pompe péristaltique (Gilson, type minipulsé) ;
- . un détecteur UV, DO : 280 nm (Pharmacia, S.P.M. UV - 1), équipé d'une cellule HR-10 ;
- . un enregistreur (Pharmacia, REC - 482).

25

La source à purifier est 700 ml d'un mélange de plasmas à bon titre anticorps anti-pollen dilués au demi avec du tampon phosphate 0,1 M pH 7,5 (soit 1400 ml au total). Les 1400 ml de plasma dilué (environ 25 g l⁻¹ de protéines) ont été injectés dans la colonne à un débit de 70 ml par heure, assurant un temps de séjour d'un vingtaine de minutes.

30

Après lavage avec du tampon phosphate 0,1 M pH 7,5, les anticorps spécifiques sont élués par du tampon citrate /glycine 0,1 M pH 2,5 (21 g d'acide citrique de pM 210,14 + 6 g de glycine de PM 75, qsp 1 l d'eau PPI). L'éluat est neutralisé extemporanément avec du Tris solide.

35

b) Suivi analytique

- Dosages des classes d'immunoglobulines G, M et A dans l'éluat.
Ils sont effectués par néphélémétrie. On utilise un analyseur immunochimique (immuno-chemistry analyser ISC II Beckman).
- Dosages des Ig E dans l'éluat.
Ils sont réalisés à l'aide d'un kit EIA (Pharmacia).
- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 4/30 (Pharmacia) en présence de SDS.

2) RESULTATS

Le tableau 1 présenté ci-après, rend compte des résultats obtenus :

TABLEAU 1	
	Concentration (mg / l ⁻¹)
- Ig G (néphélémétrie)	200
- IgM (néphélémétrie)	95
- IgA (néphélémétrie)	25
- IgE (EIA)	2
Pureté électrophorétique des Ig totales	> 95%

Sachant que le volume total de l'éluat (après neutralisation) est de 58 ml, on a ainsi purifié à partir de 700 ml d'un mélange de plasma :

11,6 mg	d'IgG
5,5 mg	d'IgM
1,5 mg	d'IgA
0,116 mg	d'IgE

5 Exemple 2 : activité biologique in vitro des anticorps anti-pollen

L'activité biologique des anticorps anti-pollen purifiés par la méthode décrite exemple 1, a été évaluée in vitro à l'aide du test de libération d'histamine par les basophiles de patients allergiques mis en présence d'allergènes, la capacité des anticorps à inhiber cette
10 libération d'histamine a été évaluée sur ce modèle.

1) MATERIEL ET METHODES

a) Préparation des solutions et tampons

15

- . EDTA 125 mM pH 7,4 dans l'eau distillée.
- . Glucose-Dextrane : à 3% (p/v) dans du sérum physiologique.
- . Tampon Tris-albumine, pour le lavage des cellules : Tris 25 mM, NaCl 5 mM, KCl 5 mM, albumine humaine 0,03% (p/v) dans l'eau distillée
20 (pH 7,6).
- . Tampon Tris-albumine - Ca^{2+} - Mg^{2+} , pour incubations des cellules dans l'expérience de libération d'histamine proprement dite : Tris 25 mM / NaCl 5 mM, KCl 5 mM / CaCl_2 , 2 H₂O 0,6 mM / MgCl_2 , 6 H₂O 1 mM, albumine humaine 0,03% (p/U), dans l'eau distillée
25 (pH = 7,6).

b) Patients

Des patients allergiques au pollen de dactyle (*dactylis glomerata*) ont été
30 prélevés pour l'isolement de basophiles humains.

c) Extrait de pollen

50 mg de pollen de dactyle fournis par l'Institut Pasteur (Paris, France) sont
35 incubés sous agitation avec 450 ul d'eau distillée pendant 1 h à température ambiante, puis centrifugés à 9 000 g. Le surnageant constitue l'extrait de pollen.

d) Fractions d'immunoglobulines

Un mélange de 26 plasmas riches en anticorps anti-pollen et un produit riche en IgM et IgA issu de plasmas normaux (produit IgGAM commercialisé par BioTransfusion, France) ont été immunopurifiés selon la technique décrite dans l'exemple 1. Pendant 2 heures sous agitation et à température ambiante, ces fractions immunopurifiées sont préincubées pour différentes concentrations d'immunoglobulines totales avec de l'extrait de pollen de dactyle concentré à 2,5 ou 25 ng/ml en protéines totales, selon la sensibilité des basophiles testés (déterminée préalablement). Les dilutions sont réalisées dans du Tris-albumine - Ca^{2+} - Mg^{2+} .

e) Expérience de libération d'histamine

La technique d'histamino-libération employée est celle décrite par May et al. (1970 J. Allergy 46 : 73-89).

Dans cet exemple, toutes les fractions sont testées sur des basophiles issus d'un même patient allergique.

f) Dosage d'histamine

Le dosage fluorométrique de l'histamine est effectué selon la technique de Shore et al. (1959 J. Pharmac. exp. Ther. 127 : 182-186) sur une chaîne automatique mise au point par B. Lebel et al. (1983 - Anal. Biochem. 133 : 16-29). La méthode comprend une double extraction de l'histamine par le butanol saturé en NaCl en milieu alcalin, puis par l'acide chlorhydrique. Après alcalinisation, l'orthophtaldéhyde forme un fluorochrome avec l'histamine.

2) RESULTATS

La première fraction testée consiste en des immunoglobulines anti-pollen de dactyle immunopurifiées à partir d'un lot de 26 plasmas présélectionnés par méthode ELISA pour leur richesse en IgG4 spécifiques. L'effet inhibiteur de cette fraction est observé à partir d'une concentration 10^{-4} g/l en immunoglobulines totales. Cet effet inhibiteur augmente avec la concentration en immunoglobulines pour être totale (100% d'inhibition) dès 10^{-2} g/l. (Figure 1).

La seconde fraction consiste en des immunoglobulines anti-pollen de dactyle immunopurifiées à partir d'une sous-fraction plasmatique issue d'un lot de plasmas non présélectionnés (produit IgGAM, BioTransfusion France).

5 Cette fraction montre un effet inhibiteur dès la concentration de 10^{-5} g/l en immunoglobulines totales. Cette inhibition est dose-dépendante et quasi-totale pour une concentration en immunoglobulines de 0,4 g/l (Figure 2).

10 Par ailleurs, des tests de contrôle ont été effectués, d'une part avec des fractions d'immunoglobulines non immunopurifiées et sans spécificité particulière, d'autre part avec un échantillon du lot de 26 plasmas riches en IgG4 spécifiques, non immunopurifié. Les fractions d'immunoglobulines non spécifiques n'ont aucun effet inhibiteur sur la libération d'histamine pour des concentrations en immunoglobulines totales allant de 10^{-4} à 1 g/l, alors que l'échantillon du lot de plasmas spécifiques montre une légère inhibition pour une concentration de 1 g/l d'immunoglobulines (et plus).

20 Cette étude montre que la méthode d'immunopurification décrite permet d'isoler et de concentrer des immunoglobulines ayant un pouvoir inhibiteur sur la libération d'histamine à partir de basophiles humains mis en présence d'allergènes.

En outre, elle montre que la sélection de plasmas spécifiques n'augmente pas l'effet inhibiteur des immunoglobulines purifiées par la méthode de l'invention.

25 Exemple 3 : séparation des anticorps "primaires" anti-pollen et "secondaires" (anti IgE anti-pollen) à partir d'une fraction d'anticorps anti-pollen immunopurifiés issue d'un mélange de plasmas riches en anticorps spécifiques

30 1) MATERIEL ET METHODES

1.1 Préparation du support

a) Anticorps anti-IgE

35 Ce sont des immunoglobulines de chèvre dirigées contre le Fc des IgE humaines (Nordic Immunology).

20 mg de ces anticorps (sous 8 ml) sont dialysés contre 2 litres de tampon NaH CO₃ 0,1 M, NaCl 0,5 M pH 8,3, 16 heures à +4°C sous agitation.

b) Préparation du gel et couplage des anticorps

La méthodologie est celle décrite exemple 1.

5 **1.2 Chromatographie**

L'essai a été réalisé sur une colonne IBF 11 contenant 5,5 ml du gel susmentionné. Le système chromatographique est identique à celui décrit exemple 1.

10 La source à purifier est un mélange d'éluats contenant les anticorps anti-pollen purifiés selon l'exemple 1, qui a été concentré (8 ml à raison de 1,05 g/l d'IgG / 0,45 g/l d'IgM / 0,13 g/l d'IgA et 10 mg/l d'IgE) et dialysé 16 heures à +4°C contre du tampon phosphate 0,1 M pH 7,5.

15 La source a été injectée dans la colonne à un débit de 14 ml par heure, assurant un temps de séjour d'une vingtaine de minutes. Après lavage avec du tampon phosphate 0,1 M pH 7,5, les anticorps retenus ont été élués par du tampon citrate/glycine 0,1 M pH 2,5 (cf exemple 1). L'éluat est neutralisé extemporanément avec du Tris solide.

20 Le filtrat et l'éluat sont récoltés soigneusement. Les dosages des différentes classe d'immunoglobulines sont effectués comme dans l'exemple 1.

25

30

35

5 2) RESULTATS

Le tableau 2 présenté ci-après, rend compte des résultats obtenus :

10

15

20

TABLEAU 2								
Bilan de la chromatographie								
Concentrations					Quantités			
En gl^{-1}				en $mg l^{-1}$	en mg			en μg
	IgG	IgM	IgA	IgE	IgG	IgM	IgA	IgE
Source	1,05	0,45	0,13	10	8,4	3,6	1,0	80
Filtrat	0,32	0,13	0,03	0,004	3,5	1,4	0,3	0,044
Eluat	0,20	0,07	0,02	3	3,7	1,2	0,4	56

25

Les IgG, IgM et IgA présentes dans l'éluat avec les IgE sont des anticorps secondaires ou auto-anticorps. Ceci a été confirmé lorsqu'on a réalisé des immuno-empreintes avec une fraction de cet éluat chauffée 2 heures à 56°C (destruction des Fc des IgE) : les anticorps secondaires ne reconnaissent plus les allergènes immobilisés.

30

Les IgG, IgM et IgA présentes dans le filtrat sont en revanche des anticorps primaires, réellement dirigés contre les allergènes du pollen de dactyle (ceux-ci sont bien révélés en immuno-empreintes).

35

5 Exemple 4 : activité biologique in vitro des anticorps primaires anti-pollen et des anticorps secondaires

L'activité biologique des anticorps primaires et secondaires anti-pollen dont la préparation est décrite dans l'exemple 3 a été évaluée de la même manière que dans l'exemple 2.

10

Dans la figure 3, sont comparées les activités biologiques in vitro :

- de la fraction purifiée par chromatographie sur allergène immobilisée (dite fraction de départ) ;
- 15 - du filtrat c'est-à-dire fraction non retenue après passage dans la colonne comportant des anticorps anti-IgE humaines immobilisés, de la fraction de départ;
- de l'éluat c'est-à-dire les fractions retenues après passage dans la colonne comportant des anticorps anti-IgE humaines immobilisés, de la fraction de
- 20 départ.

La fraction "anticorps primaires" est la fraction non retenue (filtrat). Elle est considérablement appauvrie en IgE, comme l'indique l'exemple 3.

25 La figure 3 indique un effet biologique in vitro de cette fraction, équivalent à celui de la fraction de départ (en dépit d'une absence d'activité à 10^{-4} g/l).

La fraction "anticorps secondaires" qui contient les IgE anti-pollen de dactyle est la fraction retenue (éluat). La figure 3 indique également que l'effet biologique de cette fraction est peu différent de celui de la fraction de départ.

30

Ces résultats indiquent que le pouvoir inhibiteur de la libération d'histamine, de la fraction purifiée selon l'exemple 1, est porté à la fois par des immunoglobulines primaires dirigées contre les allergènes de pollen et par des immunoglobulines secondaires ou auto-anticorps anti-IgE, et ce, de façon équivalente.

35

5 CONCLUSION

L'ensemble des résultats présentés dans les exemples ci-dessus, indique qu'il est possible de purifier, à partir de plasmas humains, sélectionnés ou non, en une étape, un mélange d'immunoglobulines spécifiques d'allergènes et présentant une activité anti-
10 allergénique importante.

Cette activité est apportée par toutes les classes d'immunoglobulines à savoir IgG, IgM, IgA et IgE.

15 Elle est le fait en outre des anticorps primaires anti-allergènes et des anticorps secondaires ou auto-anticorps anti-IgE.

L'utilisation d'un tel mélange d'immunoglobulines purifiées à partir de plasmas normaux, est donc particulièrement prometteuse pour la prévention et le traitement de
20 l'allergie.

25

30

35

REVENDECATIONS

1. Anticorps purifiés dirigés spécifiquement contre des allergènes caractérisés en ce qu'ils sont obtenus à partir de liquides biologiques, ayant subi une chromatographie d'affinité sur des antigènes spécifiques immobilisés et qu'ils présentent une activité biologique anti-allergénique.
5
2. Anticorps, selon 1, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre des allergènes de pollen de graminées.
10
3. Anticorps, selon 1 et 2, caractérisés en ce que les liquides biologiques sont des plasmas ou sérum humains ou animaux.
4. Anticorps selon les revendications 1 et 2, caractérisés en ce qu'il s'agit d'un mélange d'IgG, IgM, IgA et IgE.
15
5. Anticorps selon les revendications 1 à 4, caractérisés en ce qu'il s'agit d'un mélange d'anticorps primaires anti-pollen et d'anticorps secondaires ou auto-anticorps.
20
6. Anticorps selon les revendications 1 à 5 caractérisés en ce qu'ils présentent une pureté protéique supérieure ou égale à 50%.
7. Procédé de purification des anticorps caractérisé en ce qu'il comporte une étape de chromatographie d'immuno-affinité utilisant des allergènes communs aux pollens de graminées, immobilisés sur un support d'affinité.
25
8. Procédé de purification selon la revendication 7 caractérisé en ce que les allergènes utilisés proviennent de préférence de dactylis glomerata.
30
9. Procédé de purification selon les revendications 7 et 8 caractérisé en ce que les allergènes sont immobilisés sur un support de manière à laisser leurs épitopes accessibles aux anticorps .
- 35 10. Procédé de purification selon les revendications 7 à 9 caractérisé en que la résine utilisée porte des fonctions carboxyles et que les antigènes sont liés au support par leurs fonctions amines.

11. Procédé de purification selon l'une des revendications 7 à 9 caractérisé en ce que la résine utilisée est un gel d'agarose.

5 12. Anticorps selon l'une des revendications 1 à 6, pouvant être obtenu par le procédé selon l'une des revendications 7 à 10, caractérisés en ce qu'ils sont utilisés pour la présentation ou le traitement des allergies.

10 13. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient des anticorps selon l'une des revendications 1 à 6 et 12, pouvant être obtenus par le procédé selon l'une des revendications 7 à 11.

15

20

25

30

35

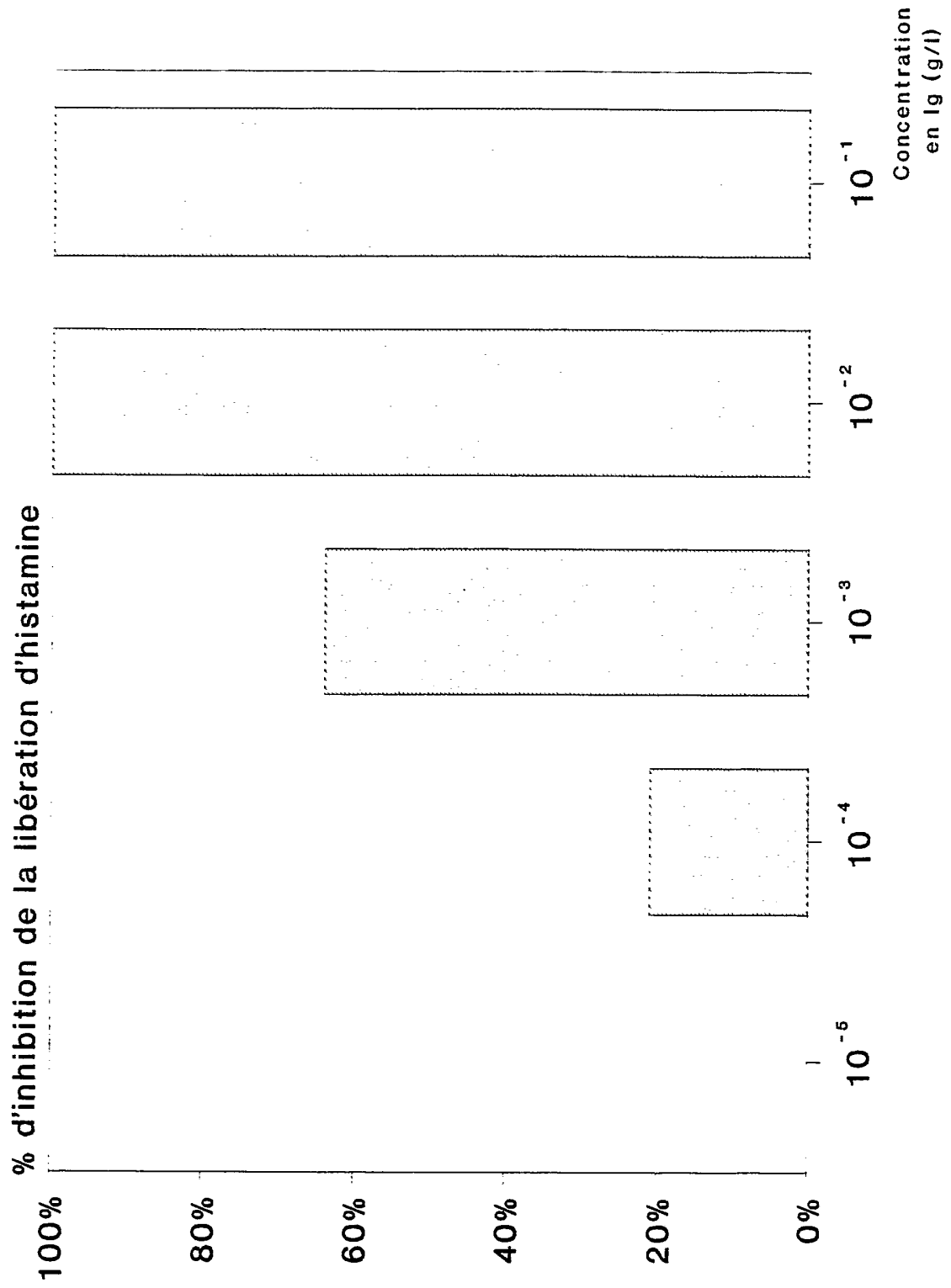


Figure 1

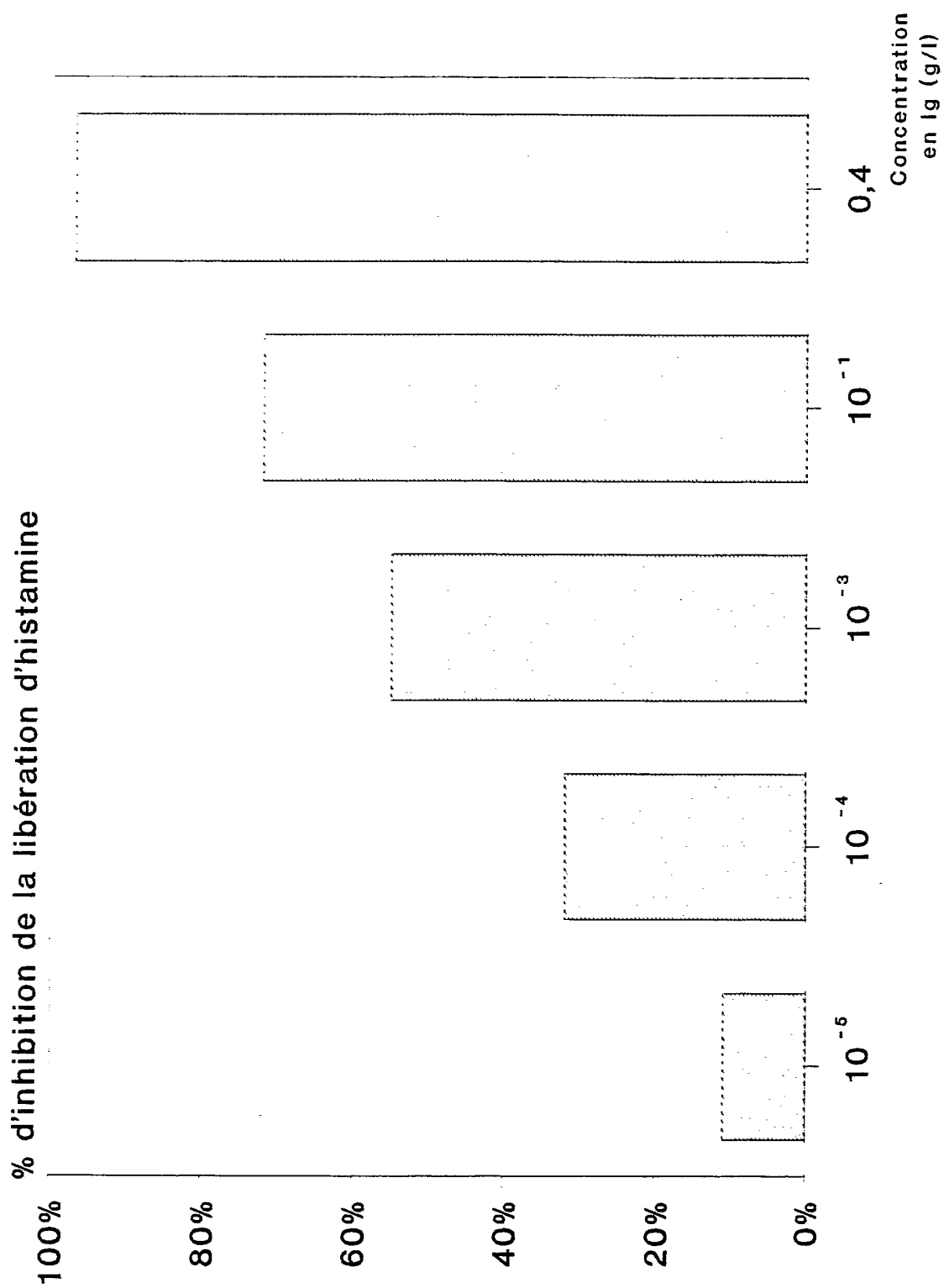


Figure 2

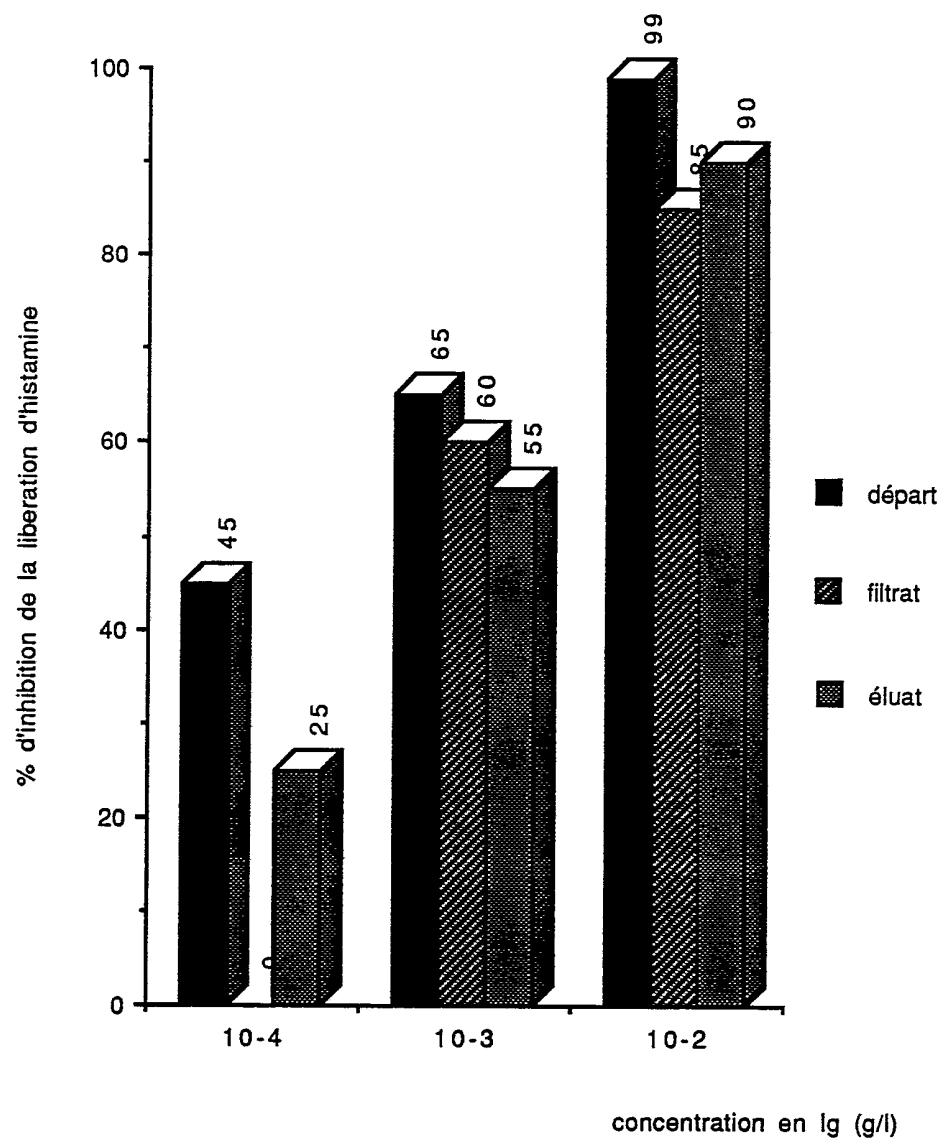


FIGURE 3

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

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

N° d'enregistrement
national

FR 9114954
FA 466423

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY vol. 88, no. 3, Septembre 1991, ST. LOUIS, ETATS-UNIS pages 349 - 355; D. VALACER ET AL.: 'Identification of anti-idiotypic antibodies in the sera of ryegrass-allergic and nonallergic individuals.' * abrégé *	1-11
X	EP-A-0 404 186 (DAICHI PURE CHEMICALS CO.) * le document en entier *	1-11
X	EP-A-0 287 361 (INTERNATIONAL INSTITUTE OF CELLULAR AND MOLECULAR PATHOLOGY) * page 4, ligne 9 - ligne 25 * * page 6, ligne 15 - ligne 61 * * revendications *	1-13
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		C07K
Date d'achèvement de la recherche 10 JUILLET 1992		Examineur NOOIJ F.J.M.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général 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		