

ROYAUME DE BELGIQUE**SPF ECONOMIE, P.M.E.,
CLASSES MOYENNES & ENERGIE****Office de la Propriété intellectuelle**

NUMERO DE PUBLICATION : 1020496A3

NUMERO DE DEPOT : 2012/0082

Classif. Internat. : A61K

Date de délivrance le : 05 Novembre 2013

Le Ministre de l'Economie,

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d'invention, notamment l'article 22;

Vu l'arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, notamment l'article 28;

Vu le procès-verbal dressé le 10 Février 2012 à 11H25 à l'Office de la Propriété Intellectuelle

ARRETE:Article unique.-Il est délivré à : OVOGENICS SA
Avenue des Croix du Feu 60, B-1410 WATERLOO(BELGIQUE)

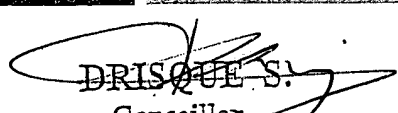
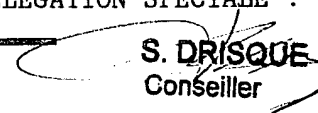
représenté(e)(s) par : COULON Ludivine, GEVERS, Holidaystraat 5 - B 1831 DIEGEM.

un brevet d'invention d'une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : COMPOSITION ANTI-INFLAMMATOIRE POUR MODULER LA REPONSE CELLULAIRE DES NEUTROPHILES ET DES EOSINOPHILES.

INVENTEUR(S) : Melsens Pascal, Avenue des Croix du Feu 60, B-1410 Waterloo (BE);
Sainte Laudy Jean Louis Charles, Avenue Estienne d'Orves 6, F-87200 Saint-Junien (BE)

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeurs(s).

Pour expédition certifiée conforme

Bruxelles, le 05 Novembre 2013
PAR DELEGATION SPECIALE :
DRISQUE S.
Conseiller
S. DRISQUE
Conseiller**.be**

**“Composition anti-inflammatoire pour moduler la réponse cellulaire
des neutrophiles et des éosinophiles”**

La présente invention se rapporte à une composition anti-inflammatoire destinée aux humains et aux animaux comprenant un extrait
5 d'œuf de caille *Corturnix corturnix japonica* de souche B-Mina comprenant un ovomucoïde et un ovoinhibiteur d'œuf de caille.

L'ovomucoïde est une enzyme inhibitrice de protéases (enzyme anti-protéases) qui est présente dans le blanc de l'œuf des oiseaux et qui comporte trois ponts disulfures et des résidus glucose,
10 mannose, désoxy-glucose et acide sialique. Ce polypeptide comprend trois domaines fonctionnels très similaires capables chacun de fixer une protéase, par exemple la trypsine (on parle alors d'activité anti-trypsique).

L'ovoinhibiteur est une glycoprotéine dont la structure est différente de celle de l'ovomucoïde. Comme l'ovomucoïde, l'ovoinhibiteur
15 fait partie des inhibiteurs des protéases à sérine. Il s'agit d'un inhibiteur puissant de la trypsine bovine, de l' α -chymotrypsine, de la chymotrypsine de poulet, de l'élastase, de la subtilisine (de *Bacillus subtilis*) et de protéases bactériennes et fongiques.

Les protéases sont des enzymes dotées de propriétés pro-inflammatoires protéolytiques contenues dans les granulations intra-
20 cytoplasmiques des cellules immunitaires (mastocytes, basophiles, neutrophiles et éosinophiles, par exemple).

D'une part, certaines protéases, parmi lesquelles les sérine-protéases, sont impliquées chez l'homme, dans différents processus
25 physiologiques de base tels que la coagulation, l'activation du complément, la réparation tissulaire et l'immunité. Les sérine-protéases interviennent également dans la cascade d'activation des basophiles et des mastocytes. Par exemple, les sérine-protéases sont présentes dans les mastocytes pulmonaires sous forme de tryptase et de chymase qui
30 sont impliquées dans la cascade d'activation des basophiles et des mastocytes. Il a été montré que des anti-protéases peuvent inhiber

l'activation des mastocytes comme le diisopropylfluorophosphate (DFP) qui inhibe la libération de l'histamine par les mastocytes pulmonaires. Par ailleurs, des anti-protéases appartenant au groupe des serpins (antithrombine III et C1s estérase inhibiteur) permettent d'inhiber

5 l'agrégation induite par le fMLP entre les neutrophiles et les plaquettes. De même, la protéinase 3 (PR3) qui est l'antigène cible des c-ANCA (cytoplasmic antineutrophil cytoplasmic antibodies) est inhibée par l'alpha-1 antitrypsine.

D'autre part les protéases libérées par les cellules pro-

10 inflammatoires, par exemple lors d'une inflammation, peuvent conduire à une aggravation des symptômes comme c'est par exemple le cas pour l'asthme ou la fibrose kystique. Il a également été montré que des protéases libérées par des cellules pro-inflammatoires tels que les neutrophiles peuvent induire la production d'ions superoxydes et de

15 cytokines pro-inflammatoires telle que l'IL8 conduisant au recrutement de neutrophiles au niveau du site de la réaction inflammatoire et ainsi à une aggravation des symptômes comme c'est le cas pour l'asthme et la fibrose kystique. Dans de tels cas, un parfait équilibre protéases/anti-protéases est recherché pour atténuer les symptômes et il est dès lors parfois utile

20 de favoriser cet équilibre en apportant des inhibiteur de protéases, par exemple par l'intermédiaire d'un ovomucoïde.

Les principales cellules sanguines ayant une action pro-inflammatoire rapide (inférieure à une heure) sont les basophiles, les éosinophiles et les neutrophiles.

25 Les basophiles sont des cellules faiblement représentées chez l'homme et susceptibles d'infiltrer le site tissulaire de la réaction inflammatoire. Les basophiles sont de puissantes cellules pro-inflammatoires contenant, dans leurs granules, de nombreux médiateurs préformés tels que l'histamine et des protéases qui seront libérées après

30 une activation par des cellules basophiles. L'activation des cellules basophiles peut être déclenchée par des mécanismes non dépendants

des anticorps ou dépendants des anticorps et est principalement médiée par les IgE, les IgG et les IgA. Cette activation induit la libération de médiateurs, en particulier l'histamine qui provoque une réponse immunitaire. Ces différents mécanismes impliquant les cellules basophiles
5 sont généralement observés lors de réactions inflammatoires allergiques.

Les éosinophiles sont des cellules sanguines retrouvées dans les tissus au niveau des sites de réactions inflammatoires et jouant un rôle régulateur majeur sur le système immunitaire. Les cellules éosinophiles possèdent des récepteurs membranaires pour les IgG, pour
10 les IgA et pour les IgE ainsi que pour diverses cytokines (IL2, IL3, IL5, IFN γ). L'activation des éosinophiles aboutit à leur dégranulation avec une libération de nombreux médiateurs parmi lesquels des protéines (MBP, ECP et EDN) et des enzymes (protéase, peroxydase, collagénases, β -glucuronidase, lysophosphatase, phospholipases, histaminases,
15 catalases, estérases, hexosaminidases, ...). L'activation des éosinophiles conduit, en outre, à la sécrétion de radicaux oxygénés impliqués dans le stress oxydatif et à la libération de dérivés de la voie de la cyclo-oxygénase. Les cellules éosinophiles sont impliquées dans de nombreuses pathologies telles que la gastrite, l'oesophagite, la proctocolite
20 à éosinophile, la colite ulcéreuse, la maladie de Crohn, le syndrome de Churg-Strauss, la pneumonie à éosinophiles et les maladies parasitaires. Toutefois, les causes les plus fréquentes d'éosinophilie sont les maladies inflammatoires allergiques comme la dermatite atopique, la rhinite allergique et l'asthme.

25 Les neutrophiles sont des cellules pro-inflammatoires essentielles qui sont les premières cellules recrutées après des dommages tissulaires et en réponse à des agents infectieux ou à des allergènes. Ces cellules sont également impliquées dans le stress oxydatif et sont ainsi capables de libérer des dérivés oxygénés
30 extrêmement actifs et toxiques pour les tissus sur le site de la réaction

inflammatoire. Les neutrophiles peuvent être activés par la voie des IgA, des IgG et même des IgE.

Les cellules neutrophiles et éosinophiles sont susceptibles de libérer, après leur activation, des enzymes protéolytiques (protéases) aux effets parfois délétères sur les tissus, ce qui a notamment été démontré dans le cas de l'asthme. C'est pourquoi un équilibre protéases/anti-protéases est recherché pour atténuer les symptômes, ce qui peut être obtenu par l'apport d'inhibiteurs de protéases, par exemple par l'intermédiaire d'un ovomucoïde inhibiteur des protéases.

L'utilisation de l'ovomucoïde de l'œuf de caille en tant qu'inhibiteur des protéases dans les réactions inflammatoires est connue de l'état de la technique. Des études antérieures ont démontré l'effet inhibiteur de l'ovomucoïde de l'œuf de caille sur l'activation des basophiles humains stimulés par un peptide bactérien, le N-formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP).

Par exemple, le document FR2901137 décrit plusieurs formes galéniques médicamenteuses destinées à la médecine humaine et animale, constituées par un ou plusieurs inhibiteurs naturels des enzymes protéasiques. Ce document divulgue ainsi des compositions médicamenteuses à base d'inhibiteurs naturels de protéase extraits d'œufs de caille, associés à des vitamines et/ou à des minéraux et/ou à des acides aminés et incorporés dans un excipient. Ces compositions médicamenteuses présentent une activité anti-inflammatoire globale ciblée sur tous les tissus et organes, une activité anti-inflammatoire non spécifique basée sur l'inhibition de la trypsine ou de ses homologues (élastase, tryptase, ...) et une activité anti-inflammatoire anti-allergique spécifique basée sur l'inhibition de la libération de médiateurs chimiques par les mastocytes ou les basophiles. Ces compositions médicamenteuses peuvent se présenter sous forme de comprimés comprenant un ou plusieurs inhibiteurs naturels des sérine-protéases, comme l'ovomucoïde et l'ovoinhibiteur extrait du blanc de l'œuf de caille

de l'espèce *Corturnix corturnix japonica* de souche B-Mina et divers constituants tels que par exemple des vitamines et/ou des acides aminés. Plus particulièrement, ces compositions médicamenteuses sont indiquées pour la prévention et le traitement des inflammations.

- 5 Le document FR2813531 porte également sur des compositions médicamenteuses comprenant un homogénat d'œuf de caille associé à des oligo-éléments et possédant une activité anti-protéasique et anti-inflammatoire. Ces compositions médicamenteuses présentent une activité anti-allergique non spécifique basée sur l'activité
- 10 anti-protéasique de l'ovomucoïde de l'œuf de caille, une activité anti-inflammatoire par inhibition de la libération de l'histamine par les mastocytes et les basophiles et une activité dermatologique par action sur les protéases des cellules spécialisées du derme, par exemple les neutrophiles. Ces compositions médicamenteuses peuvent se présenter
- 15 sous formes de comprimés composés d'un homogénat d'œufs de caille (jaune et blanc) possédant une activité anti-protéasique, anti-inflammatoire et anti-infectieuse liée à la fraction ovomucoïde contenue dans le blanc de l'œuf et d'un ou plusieurs éléments incorporés. Ces compositions médicamenteuses sont indiquées notamment pour la prévention et le
- 20 traitement des maladies allergiques, des infections respiratoires et de certaines affections cutanées.

- Le document FR2939044 décrit des compositions médicamenteuses constituées d'un lyophilisat de lait d'ânesse mélangé à un ou plusieurs inhibiteurs naturels d'enzymes protéasiques humaines tels
- 25 que l'ovomucoïde et l'ovoinhibiteur extraits de l'œuf de caille de l'espèce *Corturnix corturnix japonica* de souche B-Mina. Cette formulation est indiquée dans la prévention et le traitements de pathologies affectant le système immunitaire mais aussi pour la mise en oeuvre de compléments alimentaires ou de produits cosmétiques. En effet, cette formulation
- 30 présente une forte valeur nutritionnelle, une activité anti-inflammatoire globale sur tous les tissus et organes, une activité anti-inflammatoire non

spécifique liée aux inhibiteurs de protéases humaines, une activité anti-inflammatoire et anti-allergique spécifique grâce à l'inhibition de la libération de médiateurs chimiques excrétés par les cellules basophiles et les mastocytes et activité anti-inflammatoire dermatologique en exerçant
5 une action inhibitrice sur les enzymes de l'inflammation.

En regard de l'art antérieur, il existe d'une part une activité anti-protéasique des ovomucoïdes et des ovoinhibiteurs de l'œuf de caille *Corturnix corturnix japonica* de souche B-Mina agissant sur les protéases humaines impliquées dans les mécanismes inflammatoires et allergiques
10 comme par exemple sur la trypsine et ses homologues (élastase, trypase, ...). Cette activité anti-protéasique agit donc sur les protéases après leur libération par les cellules pro-inflammatoires telles que les mastocytes, les basophiles, les éosinophiles et les neutrophiles. Il existe d'autre part une activité modulateur de la réponse à une stimulation par des agents
15 infectieux ou des allergènes des cellules pro-inflammatoires mastocytes et basophiles qui est divulguée dans l'état de la technique.

Toutefois, aucune modulation de la réponse inflammatoire des éosinophiles et des neutrophiles n'est divulguée à ce jour, c'est-à-dire qu'aucune action avant la libération des protéases par ces cellules
20 éosinophiles et neutrophiles n'est divulguée aujourd'hui. En effet, toutes les études réalisées jusqu'à présent ciblent l'action de l'ovomucoïde après la sécrétion des protéases par les cellules pro-inflammatoires, aucune étude n'envisageant une action de l'ovomucoïde sur les neutrophiles et les éosinophiles avant la libération des protéases.

25 La présente invention se rapporte à une utilisation particulière de l'ovomucoïde de l'œuf de caille *Corturnix corturnix japonica* de souche B-Mina dans une composition anti-inflammatoire destinée aux humains et aux animaux pour moduler la réponse cellulaire des neutrophiles et des éosinophiles, c'est-à-dire qui agit sur les cellules pro-
30 inflammatoires avant la libération des médiateurs de la réaction inflammatoire comme les protéases. Dans le cadre de la présente

invention, il a en effet été observé de façon tout à fait surprenante que l'ovomucoïde agit également en tant que modulateur de la réponse cellulaire des neutrophiles et des éosinophiles avant la libération des protéases. Cette action surprenante de l'ovomucoïde est particulièrement

5 avantageuse puisqu'elle permet d'agir directement sur les deux principales cellules pro-inflammatoires impliquées lors de réaction inflammatoires tissulaires pour en moduler les réponses cellulaires et ainsi empêcher la libération de médiateurs tels que les protéases. Ceci permet donc de

10 minimiser les réactions inflammatoires en agissant avant la libération de protéases au départ des neutrophiles et des éosinophiles grâce au mécanisme d'inhibition intracellulaire de l'ovomucoïde de l'oeuf de caille sur les neutrophiles et les éosinophiles mis en avant dans le cadre de la présente invention, complémentaire à l'activité anti-protéasique décrite

15 dans l'état de la technique et à la réponse modulateur sur les mastocytes et les basophiles. Cette activité modulateur est d'autant plus surprenante qu'il n'était pas évident de mettre en évidence un mécanisme se produisant en amont d'un phénomène recherché et attendu qu'il y avait lieu de provoquer pour en observer la libération de protéases pour pouvoir les inhiber. De plus, l'art antérieur est muet au sujet de la modulation de la

20 réponse cellulaire des éosinophiles et des neutrophiles. D'ailleurs, si l'état de la technique divulgue la modulation de la réponse cellulaires des mastocytes et des basophiles, rien ne laisse présager que les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la libération des médiateurs chimiques par les mastocytes et les basophiles par les ovomucoïdes serait identique pour

25 l'inhibition de la libération des médiateurs chimiques par les éosinophiles et par les neutrophiles. Si l'état de la technique divulgue l'inhibition de l'activation des basophiles et que les résultats obtenus sur les mastocytes sont déduits de la littérature et concernent d'autres anti-protéases, il est apparu de manière surprenante qu'une inhibition de l'activation des

30 éosinophiles et des neutrophiles avait lieu alors que ces mécanismes sont inconnus à ce jour.

Avantageusement, la composition anti-inflammatoire selon l'invention comprend en outre au moins une vitamine choisie dans le groupe constitué des vitamines A, B, C, D, E, F, K et P. Ces vitamines sont connues pour leur aptitude à renforcer le système immunitaire.

5 De façon tout aussi avantageuse, la composition anti-inflammatoire selon l'invention comprend en outre au moins un minéral choisi dans le groupe constitué de Al, Bi, Co, Cu, Fe, F, Li, Mg, Ni, P, K, Se, S et Zn. Ces minéraux sont également connus pour leur aptitude à renforcer le système immunitaire.

10 De préférence, la composition anti-inflammatoire selon l'invention comprend en outre au moins un acide aminé choisi dans le groupe constitué de Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val, Glu et Gln. Ces acides aminés sont également connus pour leur aptitude à renforcer le système immunitaire.

15 Avantageusement, la composition anti-inflammatoire selon l'invention comprend en outre au moins un extrait végétal choisi dans le groupe constitué des extraits végétaux de racines, de tiges, de feuilles, de fleurs et de fruits.

Préférentiellement, la composition anti-inflammatoire selon l'invention comprend en outre un excipient pharmaceutiquement acceptable ou un excipient compatible avec l'alimentaire.

De préférence, la composition anti-inflammatoire selon l'invention est conditionnée sous forme de comprimés, de globules, de gélules, de granules, de poudre, de fluides, de liquides, de crèmes ou de
25 sprays.

Avantageusement, la composition anti-inflammatoire selon l'invention comprend du Zn sous une forme protégée, par exemple du bisglycinate de Zn (Zn protégé entre deux glycines). Il est en effet apparu que le Zn sous forme protégée, en particulier le bisglycinate de Zn agit à la
30 fois sur l'immunité et l'inflammation chronique par le biais de l'induction de la synthèse de cytokines spécifiques et par antagonisme du stress oxydant.

en tant qu'élément fondamental des enzymes impliquées dans le métabolisme des radicaux oxygénés.

Avantageusement, la composition anti-inflammatoire selon l'invention est administrée sous forme d'un complément alimentaire.

5 D'autres formes de réalisation de la composition anti-inflammatoire sont mentionnés dans les revendications annexées.

D'autres caractéristiques, détails et avantages de l'invention ressortiront de la description donnée ci-après, à titre non limitatif et en faisant référence aux exemples et aux figures annexés.

10 La figure 1 illustre l'effet de l'ovomucoïde de l'œuf de caille *Corturnix corturnix japonica* de souche B-Mina à la concentration de 10 µg/ml sur l'activation des éosinophiles par le peptide bactérien fMLP.

La figure 2 illustre l'effet de l'ovomucoïde de l'œuf de caille *Corturnix corturnix japonica* de souche B-Mina à la concentration de 10 µg/ml sur l'activation des neutrophiles par le peptide bactérien fMLP.

15 Les réactions inflammatoires exagérées pouvant être pathogènes pour l'homme sont appelées réactions d'hypersensibilité. Depuis 2003, et sur les recommandations de l'Académie Européenne d'Allergologie et d'Immunologie Clinique, on distingue les
20 hypersensibilités immunes (anticorps dépendantes ou impliquant des cellules du système immunitaire tels que les lymphocytes) et les hypersensibilités non immunes n'impliquant pas les éléments du système immunitaire et générant directement des éléments pro-inflammatoires ou ayant une action toxique directe.

25 En immuno-allergologie, des allergènes communs comme les moisissures, la blatte ou les acariens montrent une activité protéolytique, cystéine protéases pour les allergènes Der f1 et Der p1 et sérine protéase pour les allergènes Der p3, 6, 9 Ces protéases sont actives par l'intermédiaire de récepteurs PAR (protéase-activated receptors) et sont
30 impliquées dans le recrutement des éosinophiles et dans l'hyperactivité bronchique dans un modèle murin d'inflammation allergique.

Les principales cellules sanguines ayant une action pro-inflammatoire rapide (inférieure à une heure) mais étant également impliquées dans des mécanismes retardés, sont les basophiles, les neutrophiles et les éosinophiles.

5 L'éosinophile est essentiellement tissulaire et particulièrement au niveau digestif. Les principales causes d'hyperéosinophiles sont l'eczéma atopique, la rhinite allergique et l'asthme mais on connaît aujourd'hui de nombreuses pathologies digestives dans lesquels on observe un recrutement très important des
10 éosinophiles. Le rôle de l'éosinophile dans l'immunomodulation est aujourd'hui reconnu. Cette cellule est rapidement présente sur le site de la réaction inflammatoire et est essentiellement localisée au niveau des muqueuses.

L'éosinophile contient de nombreux médiateurs cytotoxiques tels que
15 l'éosinophil peroxydase (EPO) qui sont libérés par dégranulation mais les inhibiteurs de la dégranulation des éosinophiles sont peu connus. Les éosinophiles isolés de patients asthmatiques contiennent une activité élevée de type chymotrypsine ce qui semble impliquer ces protéases dans les mécanismes de dégranulation. Ainsi, le mésilate de nafamostat,
20 puissant inhibiteur des sérine-protéases, inhibe non seulement l'activité protéolytique mais augmente aussi le nombre d'éosinophiles dans le BAL (lavage broncho-alvéolaire). De même, le SLPI (secretory leucocyte protéase inhibiteur) inhibe, dans un modèle d'allergie conjonctivale, le développement de la conjonctivite chez le cobaye.

25 L'inflammation allergique se décompose en deux phases principales, à savoir une phase immédiate et une phase tardive. L'effet délétère des éosinophiles est surtout impliqué dans la phase tardive et au cours du passage à la chronicité. Les interactions intercellulaires sont multiples et un couple pro-inflammatoire puissant est représenté par le
30 couple éosinophile-mastocyte.

L'éosinophile est une cellule sanguine retrouvée dans les tissus sur le site des réactions inflammatoires, colonisant spontanément les muqueuses et douée d'une dualité fonctionnelle caractéristique, participant à la défense anti-tumorale et parasitaire mais jouant également un rôle régulateur majeur sur le système immunitaire. Cette cellule décrite pour la première fois par Paul Ehrlich (1854-1915) est caractérisée par la couleur rouge brique prise par ses granules colorés par l'éosine, du fait de la présence de protéines fortement basiques.

L'éosinophile possède des récepteurs membranaires pour les IgG (FcγRI et FcγRII), pour les IgA (FcαRI) et pour les IgE (FcεRI et FcεRII) ainsi que pour diverses cytokines (IL2, IL3, IL5, IFNγ). L'activation des éosinophiles aboutit à leur dégranulation avec libération de nombreux médiateurs : des médiateurs parmi lesquels des protéines (MBP (major basic protein), ECP (eosinophil cationic protein) et EDN (eosinophil derived neurotoxin) et des enzymes EPO (eosinophil peroxydase), collagenases, βglucuronidase, lysophosphatase, arysulfatase et phosphatase acide, phospholipases, histaminases, catalases, estérases, hexosaminidases. L'activation des éosinophiles conduit, en outre, à la sécrétion de radicaux oxygénés du stress oxydatif. Ils libèrent également du LTC₄, du PAF et des dérivés de la voie de la cyclooxygénase.

De plus, ils produisent de nombreuses cytokines et particulièrement des cytokines immuno régulatrices (IFNγ, IL2, IL12, IL4, IL10, IL3), des cytokines pro-inflammatoires (IL1, IL6, TNFα), des cytokines anti-inflammatoires (TGFα et β) et des chemokines (RANTES, éotaxine).

L'activation des éosinophiles peut être médiée par les IgE, les IgG ou les IgA, cette dernière pouvant même être, dans certaines situations, plus activatrice que l'IgE et est souvent sous-estimée.

Le neutrophile occupe une place centrale en tant que cellule essentielle de défense et pro-inflammatoire. Cette cellule est impliquée dans le stress oxydatif car susceptible, à l'image de

l'éosinophile, de libérer des dérivés oxygénés extrêmement actifs et toxiques pour les tissus sur le site de la réaction inflammatoire.

Les neutrophiles peuvent être activés par des voies non immunes et immunes et, parmi celles-ci, par la voie des IgA, des IgG et même des IgE. En effet, les neutrophiles expriment le récepteur de haute affinité pour l'IgE et sont les premières cellules recrutées après dommage tissulaire, agent infectieux ou allergènes. Ainsi, la provocation allergénique bronchique induit un recrutement massif de neutrophiles au niveau pulmonaire chez l'homme et l'animal.

De plus, les neutrophiles activés synthétisent de l'IL8 au cours d'une activation IgE dépendante laquelle induit un afflux supplémentaire de neutrophiles. Le neutrophile, comme l'éosinophile, est susceptible de libérer, après activation, des enzymes protéolytiques aux effets délétères sur les tissus.

Il a donc été, selon la présente invention, démontré que l'ovomucoïde de l'oeuf de caille était capable d'inhiber, outre l'activation des basophiles induite par le fMLP (N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine), peptide bactérien possédant des récepteurs spécifiques membranaires sur les polynucléaires humains, l'activation des éosinophiles et des neutrophiles par le fMLP.

Exemple 1 : effet inhibiteur de l'ovomucoïde de l'oeuf de caille Corturnix corturnix japonica de souche B-Mina sur les éosinophiles.

Un volume de 0,5 ml de sang est prélevé et dilué 3 fois dans le tampon calcium (127 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM Trizma, 5mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 5 IU/ml héparine, pH 7,4) selon les conditions suivantes :

- témoin négatif : 60 µl de tampon calcium sont ajoutés à 60 µl de la solution précédente (solution n°1) ;
- témoin positif : 60 µl de la solution de N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (fMLP 10⁻⁷M, Sigma, USA) sont ajoutés à 60 µl de la solution précédente (solution n°2);

- échantillon test : 60 µl de la solution de la dilution de l'ovomucoïde de l'œuf de caille *Corturnix corturnix japonica* de souche B-Mina à la concentration de 10 µg/ml sont ajoutés à 60 µl de la solution précédente (solution n°3).

5 Les solutions ainsi obtenues sont pré-incubées durant 30 min à température ambiante. Ensuite, 60 µl de tampon calcium sont ajoutés à la solution n°1 (témoin négatif – bloc A à la figure 1) tandis que 60µl de la solution de N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (fMLP 10-7M, Sigma, USA) sont ajoutés aux solutions n°2 et n°3 (blocs B et C à la
10 figure 1) avant une deuxième incubation de 30 min à 37°C.

Dans chacun des trois échantillons, les leucocytes sont spécifiquement marqués et incubés 15 min à température ambiante et à l'obscurité après ajout d'un cocktail d'anticorps marqués (anti-IgE, anti-CD63, anti-CD11b, anti-CD49d). Le CD49d est un marqueur permettant la
15 sélection des éosinophiles ainsi que la sélection négative des neutrophiles. Les suspensions leucocytaires ainsi préparées sont ensuite lysées (tampon chlorure d'ammonium) avant une analyse (n=10) par cytométrie en flux (XL Coulter Beckman) permettant de caractériser et de trier les
20 cellules qui sont entraînées par un flux dans le faisceau d'un laser, la lumière réémise permettant de distinguer les différents types de cellules. Il est ainsi possible de distinguer si les marqueurs s'expriment ou non, c'est-à-dire si les éosinophiles sont activés ou non en mesurant l'intensité de fluorescence (FI).

Les résultats obtenus par cytométrie en flux sont illustrés à la Figure 1. Les
25 résultats indiquent que l'ajout de l'ovomucoïde à la solution comprenant des éosinophiles et le peptide bactérien fMLP réduit significativement ($P < 0,001$) l'expression du marqueur CD11b, ce qui démontre le rôle immunomodulateur de l'ovomucoïde sur la réponse cellulaire des éosinophiles. En effet, la moyenne d'intensité de fluorescence mesurée
30 pour les échantillons contenant l'ovomucoïde est significativement inférieure à la moyenne d'intensité de fluorescence mesurée pour le

témoin positif. La diminution de l'intensité de fluorescence du marqueur CD11b démontre une inhibition de l'activation par le fMLP. Le CD11b est une intégrine très impliquée dans la communication avec les cellules épithéliales et a un rôle physiologique majeur dans la migration des éosinophiles sur le site de la réaction inflammatoire. Une inhibition de l'expression de CD11b correspond donc à la fois à une inhibition de l'activation cellulaire et donc potentiellement à l'inhibition de la libération de médiateurs mais également à une diminution du recrutement de ces cellules sur le site de la réaction inflammatoire.

10

Exemple 2 : effet inhibiteur de l'ovomucoïde de l'œuf de caille Corturnix corturnix japonica de souche B-Mina sur les neutrophiles.

Un volume de 0,5 ml de sang est prélevé et dilué 3 fois dans le tampon calcium (127 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM Trizma, 5mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 5 IU/ml héparine, pH 7,4) selon les conditions suivantes :

15

- témoin positif : 60 µl de la solution de N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (fMLP 10⁻⁷M, Sigma, USA) sont ajoutés à 60 µl de la solution précédente (solution n°1);

20

- échantillon test : 60 µl de la solution de la dilution de l'ovomucoïde de l'œuf de caille Corturnix corturnix japonica de souche B-Mina à la concentration de 10 µg/ml sont ajoutés à 60 µl de la solution précédente (solution n°2).

Les solutions ainsi obtenues sont pré-incubées durant 30 min à température ambiante. Ensuite, 60µl de la solution de N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (fMLP 10⁻⁷M, Sigma, USA) sont ajoutés aux solutions n°1 (bloc A à la figure 2) et n°2 (bloc B à la figure 2) avant une deuxième incubation de 30 min à 37°C.

25

Dans chacun des trois échantillons, les leucocytes sont spécifiquement marqués et incubés 15 min à température ambiante et à l'obscurité après ajout d'un cocktail d'anticorps marqués (anti-IgE, anti-CD63, anti-CD11b, anti-CD49d). Il a ainsi été possible de détecter la

30

réponse spécifique des neutrophiles en mesurant l'index d'activation du marqueur CD11b. Ces résultats sont présentés à la Figure 2. Ces résultats montrent que l'ovomucoïde de l'œuf de caille *Corturnix corturnix japonica* de souche B-Mina permet d'inhiber spécifiquement la réponse cellulaire des neutrophiles en réduisant leur activation par le peptide fMLP.

Applications potentielles

La dermatite atopique est une maladie inflammatoire de la peau qui affecte entre 10 à 15% des enfants et dont la prévalence est en constante augmentation. Plus de 2/3 des patients commencent leur affection dans la première année de vie. Pour ce qui concerne l'histoire naturelle de la maladie, les auteurs ne sont pas d'accord : certains affirment que 90% des dermatites atopiques sont en rémission avant l'âge de 10 ans tandis que d'autres affirment que seuls 60% de ces enfants ne souffriront plus d'atopie à l'âge adulte. La vérité se situe probablement entre ces deux approches, sachant que les études hospitalières sont biaisées, les petits eczémas n'arrivant pas dans les services hospitaliers. Les critères de mauvais pronostic seraient le début à un âge précoce de manifestations sévères, l'association à une allergie respiratoire de type asthme ou rhinite allergique. Parmi les différentes hypothèses immunologiques, un déséquilibre de la balance Th1/Th2 au profit des cytokines de type 2, étant à l'origine du développement d'une dermatite atopique, est soutenue par des travaux montrant l'existence chez des nourrissons d'un taux sérique élevé d'IL4 plusieurs mois avant le déclenchement de la dermatite atopique. L'IL5, cytokine majoritairement impliquée dans le recrutement tissulaire des éosinophiles, serait également intimement liée au développement d'une dermatite atopique.

Le traitement de cette pathologie repose sur l'utilisation associée de topiques, d'un régime adapté et d'une chimiothérapie allant des corticoïdes aux immunosuppresseurs.

L'éosinophile est impliqué dans de nombreuses pathologies telles que la gastrite, l'oesophagite et la proctocolite à éosinophile et d'autres maladies inflammatoires intestinales telles que la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn. On doit citer également le syndrome

5 Churg-Strauss, la pneumonie à éosinophile, et, bien entendu, les infestations parasitaires. Toutefois, les causes les plus fréquentes d'éosinophilie, dans le monde occidental, sont les maladies inflammatoires allergiques comme la dermatite atopique, la rhinite allergique et l'asthme. Dans ces pathologies, l'éosinophile n'agit pas seul

10 mais de nombreuses coopérations cellulaires sont aujourd'hui démontrées telle que la coopération éosinophile-mastocyte.

L'ovomucoïde a de plus un potentiel immunomodulateur et des effets sur la production de cytokines T cell dépendante ont été décrits. Les effets délétères des protéases issues de l'activation des

15 neutrophiles sur la muqueuse pulmonaire ont conduit à la recherche de molécules thérapeutiques spécifiques. Il a été également démontré que l'inhibition des protéases du neutrophile induisait une meilleure efficacité de la phagocytose par augmentation du burst oxygénatif. De cette façon, une application d'ovomucoïde dans le traitement de la dermatite

20 atopique et affectio similaire permet de bénéficier d'une action intracellulaire anti-protéasique de l'ovomucoïde de l'oeuf de caille laquelle s'ajoute à son activité extracellulaire naturelle. Ainsi, l'ovomucoïde de l'oeuf de caille montrant un effet inhibiteur sur l'activation des polynucléaires humains (éosinophiles, basophiles, neutrophiles) et est

25 donc un excellent candidat anti-inflammatoire, pas seulement pour la dermatite atopique.

Il est bien entendu que la présente invention n'est en aucune façon limitée aux formes de réalisations décrites ci-dessus et que bien des modifications peuvent y être apportées sans sortir du cadre des

30 revendications annexées.

REVENDEICATIONS

1. Composition anti-inflammatoire destinée aux humains et aux animaux pour moduler la réponse cellulaire des neutrophiles et des éosinophiles, comprenant un extrait d'œuf de caille *Corturnix corturnix japonica* de souche B-Mina comprenant un ovomucoïde et un ovoinhibiteur d'œuf de caille.

2. Composition anti-inflammatoire selon les revendication 1 et 2, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins une vitamine choisie dans le groupe constitué des vitamines A, B, C, D, E, F, K et P.

3. Composition anti-inflammatoire selon l'une des quelconque revendications 1 et 2, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un minéral choisi dans le groupe constitué de Al, Bi, Co, Cu, Fe, F, Li, Mg, Ni, P, K, Se, S et Zn.

4. Composition anti-inflammatoire selon l'une des quelconque revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un acide aminé choisi dans le groupe constitué de Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val, Glu et Gln.

5. Composition anti-inflammatoire selon l'une des quelconque revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un extrait végétal choisi dans le groupe constitué des extraits végétaux de racines, de tiges, de feuilles, de fleurs et de fruits.

6. Composition anti-inflammatoire selon l'une des quelconque revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un excipient pharmaceutiquement acceptable ou compatible avec l'alimentaire.

7. Composition anti-inflammatoire selon l'une des quelconque revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle est conditionnée préférentiellement sous forme de comprimés, de globules, de gélules, de granules, de poudre, de fluides, de liquides, de crèmes ou de sprays.

8. Composition anti-inflammatoire selon la revendication 3, caractérisée en ce que le Zn est du Zn protégé.

5 9. Composition anti-inflammatoire selon les revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle est administrée sous forme d'un complément alimentaire.

ABREGE

**“Composition anti-inflammatoire pour moduler la réponse cellulaire
des neutrophiles et des éosinophiles”**

- 5 La présente invention se rapporte à une composition anti-inflammatoire destinée aux humains et aux animaux pour moduler la réponse cellulaire des neutrophiles et des éosinophiles.

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL ETABLI EN VERTU DE L'ARTICLE 21 § 9 DE LA LOI BELGE SUR LES BREVETS D'INVENTION DU 28 MARS 1984

IDENTIFICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE		REFERENCE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE	
		8045937/CL	
Demande nationale belge n°		Date du dépôt	
2012/00082		10-02-2012	
		Date de priorité revendiquée	
Déposant (Nom)			
OVOGENICS SA			
Date de la requête d'une recherche de type international		Numéro attribué par l'administration chargée de la recherche internationale à la requête d'une recherche de type international	
06-03-2012		SN 57786	
I. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE (en cas de plusieurs symboles de la classification, les indiquer tous)			
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB			
A61K38/57		A61K35/56	
II. DOMAINES RECHERCHES			
Documentation minimale consultée			
Système de classification		Symboles de la classification	
IPC		A61K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents font partie des domaines consultés			
III. ☐ IT A ETE ESTIME QUE CERTAINES REVENDEICATIONS NE POUVAIENT FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)			
IV. ☐ ABSENCE D'UNITE DE L'INVENTION ET/OU CONSTATATION RELATIVE A L'ETENDUE DE LA RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)			

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Demande de recherche No

BE 201200082

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. A61K38/57 A61K35/56
ADD.

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

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
A61K

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, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X,D	FR 2 813 531 A1 (MEDIBREVEX [FR]) 8 mars 2002 (2002-03-08) cité dans la demande * le document en entier *	1-9
A	----- JOHN GORTON DAVIS ET AL: "Separation and characterization of the ovoinhibitors from chicken egg white", BIOCHEMISTRY, vol. 8, no. 5, 1 mai 1969 (1969-05-01), pages 2044-2053, XP55040013, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/bi00833a039 * le document en entier * ----- -/-	1-9



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 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, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt 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 de type international a été effectivement achevée

8 octobre 2012

Date d'expédition du rapport de recherche de type international

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

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Langer, Astrid

C.(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	GEIGER C ET AL: "MIGRATION INHIBITION FACTOR-LIKE ACTIVITY IN INFLAMMATORY SYNOVIAL FLUIDS MIGHT BE DUE TO PROTEASES", CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, vol. 26, no. 1, 1976, pages 176-180, XP009163359, ISSN: 0009-9104 * abrégé; tableaux * -----	1-9

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande de recherche n°

BE 201200082

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2813531	A1	08-03-2002	AUCUN



OPINION ÉCRITE

Dossier N° SN57786	Date du dépôt(jour/mois/année) 10.02.2012	Date de priorité (jour/mois/année)	Demande n° BE201200082
Classification internationale des brevets (CIB) INV. A61K38/57 A61K35/56			
Déposant OVOGENICS SA			

La présente opinion contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :

- ☒ Cadre n° I Base de l'opinion
- ☐ Cadre n° II Priorité
- ☐ Cadre n° III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- ☐ Cadre n° IV Absence d'unité de l'invention
- ☒ Cadre n° V Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- ☐ Cadre n° VI Certains documents cités
- ☐ Cadre n° VII Irrégularités dans la demande
- ☐ Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

Formulaire BE237A (feuille de titre) (Janvier 2007)	Examineur Langer, Astrid
---	-----------------------------

OPINION ÉCRITE

Cadre n° I Base de l'opinion

1. Cette opinion a été établie sur la base des revendications déposées avant le commencement de la recherche.
2. En ce qui concerne **la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande, le cas échéant, cette opinion a été effectuée sur la base des éléments suivants :
 - a. Nature de l'élément:
 - ☐ un listage de la ou des séquences
 - ☐ un ou des tableaux relatifs au listage de la ou des séquences
 - b. Type de support:
 - ☐ sur papier
 - ☐ sous forme électronique
 - c. Moment du dépôt ou de la remise:
 - ☐ contenu(s) dans la demande telle que déposée
 - ☐ déposé(s) avec la demande, sous forme électronique
 - ☐ remis ultérieurement
3. ☐ De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences ou d'un ou plusieurs tableaux y relatifs a été déposée, les déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles initialement fournies et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.
4. Commentaires complémentaires :

OPINION ÉCRITE

Cadre n° V Opinion motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	1-9
Activité inventive	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	1-9
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications	1-9
	Non : Revendications	

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Ad point V

Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle ; citations et explications à l'appui de cette déclaration

- 1 Le présent rapport fait mention des documents suivants cités dans le rapport de recherche. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure. A moins que d'autres indications soient données, les passages pertinents seront ceux identifiés dans le rapport de recherche:
 - D1 FR 2 813 531 A1 (MEDIBREVEX [FR]) 8 mars 2002 (2002-03-08) cité dans la demande
 - D2 JOHN GORTON DAVIS ET AL: "Separation and characterization of the ovoinhibitors from chicken egg white", BIOCHEMISTRY, vol. 8, no. 5, 1 mai 1969 (1969-05-01), pages 2044-2053, XP55040013, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/bi00833a039
 - D3 GEIGER C ET AL: "MIGRATION INHIBITION FACTOR-LIKE ACTIVITY IN INFLAMMATORY SYNOVIAL FLUIDS MIGHT BE DUE TO PROTEASES", CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, vol. 26, no. 1, 1976, pages 176-180, XP009163359, ISSN: 0009-9104
- 2 Document D1: Inhibiteurs naturels de protéase extraits d'œufs de caille, associées à des vitamines et/ou à des minéraux et/ou des acides aminées et incorporées dans un excipient. Activité anti-inflammatoire globale.
Document D2: Inhibiteurs naturels de protéase extraits d'œufs de caille (ovomucoïde, ovoinhibiteur).
Document D3: Effet MIF dans l'inflammation peut être diminué par des protéase (ovomucoïde).
- 3 **Nouveauté**
L'objet des revendications 1-9 n'est pas nouveau pour les raisons suivantes : un produit ne devient pas nouveau du fait qu'il est défini par une nouvelle propriété (activité fonctionnelle) qui n'est pas connue dans l'état de la technique, s'il n'est pas manifeste que ce paramètre ou cette propriété sert à

distinguer clairement le produit d'autres produits connus.

Tel ne semble pas être le cas ici, puisque le mécanisme d'action *in vivo* revendiqué est considéré comme une caractéristique inhérente au produit pour son utilisation selon le document D1, même si cette caractéristique n'était pas connue dans l'état de la technique.

Le groupe de patients et par ceci l'utilisation médicale de la présente demande ne se distingue pas du groupe de patients du document D1.

4 **Activité inventive**

Les **revendications 1-9**, qui ne sont pas nouvelles, manquent aussi d'activité inventive.

5 **Application industrielle**

Les **revendications 1-9** sont susceptibles d'application industrielle.