



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : A61K 39/40		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 91/15239 (43) Date de publication internationale: 17 octobre 1991 (17.10.91)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR91/00266 (22) Date de dépôt international: 3 avril 1991 (03.04.91) (30) Données relatives à la priorité: 90/04227 3 avril 1990 (03.04.90) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): FONDA- TION NATIONALE DE TRANSFUSION SANGUI- NE [FR/FR]; 6, rue Alexandre-Cabanel, F-75739 Paris Cédex 13 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : BASUYAUX, Ber- trand [FR/FR]; 73, rue de Wattignies, F-75012 Paris (FR). LAROZE, Alain [FR/FR]; 4 allée des Lacs, F- 34170 Castelnau-le-Lez (FR). TRINCOT, Anne [FR/ FR]; 22, rue du Poteau, F-75018 Paris (FR).		(74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet euro- péen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des</i> <i>revendications, sera republiée si de telles modifications sont</i> <i>reçues.</i>	
(54) Title: PURIFIED ANTIBODIES SPECIFICALLY DIRECTED AGAINST THE LIPOPOLYSACCHARIDES (LPS) OF GRAM NEGATIVE BACTERIA (54) Titre: ANTICORPS PURIFIES SPECIFIQUEMENT DIRIGES CONTRE LES LIPOPOLYSACCHARIDES (LPS) DES BACTERIES GRAM NEGATIF (57) Abstract The invention relates to purified antibodies specifically directed against the lipopolysaccharides (LPS) of gram negative bacteria. Said antibodies are characterized in that they are obtained in a single step, with an enrichment factor greater than 500 and preferably greater than 750, by immunoaffinity chromatography of the anti-LPS antibodies present in biological liquids which binds said antibodies to the LPS antibodies immobilized on a support. The invention also relates to pharmaceutical compositions containing said antibodies. (57) Abrégé La présente invention concerne des anticorps purifiés spécifiquement dirigés contre les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries gram négatif, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus en une étape avec un facteur d'enrichissement supérieur à 500 et de préférence supérieur à 750 en réalisant une chromatographie d'immunoaffinité des anticorps anti-LPS présents dans des liquides biologiques, ladite chromatographie mettant en œuvre la fixation desdits anticorps sur des antigènes LPS immobilisés sur un support. La présente invention se rapporte également aux compositions pharmaceutiques contenant lesdits anticorps.			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brésil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

ANTICORPS PURIFIES SPECIFIQUEMENT DIRIGES CONTRE LES
LIPOPOLYSACCHARIDES (LPS) DES BACTERIES GRAM NEGATIF

La présente invention se rapporte à des anticorps purifiés
5 spécifiquement dirigés contre les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries gram-négatif.

La surface de la membrane externe des bactéries à gram négatif est essentiellement constituée de lipopolysaccharides ou LPS. La libération de ces LPS dans l'organisme humain, accrue par l'utilisation
10 d'antibiotiques, induisant la libération d'endotoxines à partir de bactéries tuées, provoque des chocs graves voire mortels (80 000 morts aux Etats-Unis chaque année). En effet, parmi les actions biologiques des LPS on peut citer :

- une toxicité qui peut être mortelle,
- 15 - une modification de la régulation thermique,
- des troubles circulatoires etc.
- des modifications leucocytaires.

Peu de traitements existent à l'heure actuelle pour éviter ces chocs endotoxiniques, ce qui incite de nombreuses équipes à s'intéresser à
20 toute substance pouvant jouer un rôle antagoniste à l'action de ces LPS.

La structure des LPS de toutes les bactéries gram négatif peut être schématisée ainsi. Elles présentent toutes une structure constituée d'une partie lipidique, le lipide A, responsable en grande partie des effets toxiques des LPS. Ce lipide A est rattaché à un noyau (core) par un
25 trisaccharide le 2-céto-3-desoxyoctonate ou KDO. Sur le noyau, dont la structure polysaccharide est commune à tous les LPS, sont liées des chaînes latérales ou séquences polyosidiques qui conservent à chaque souche sa spécificité antigénique.

Des souches mutantes, dites rugueuses, ne synthétisent pas ces
30 chaînes latérales. Leurs LPS possèdent des propriétés antigéniques dues uniquement au lipide A et au noyau.

Puisque la plupart des effets toxiques de l'endotoxine sont à associer à la partie lipidique A du LPS, il a été envisagé qu'une immunisation avec des mutants rugueux des bactéries gram négatif
35 permettrait d'obtenir des anticorps susceptibles d'éviter les chocs endotoxiniques d'une grande variété d'organismes gram négatif.

FEUILLE DE REMPLACEMENT

Les anticorps dirigés contre les LPS de ces souches rugueuses seraient dirigés contre la plupart des LPS bactériens.

E. Ziegler, aux U.S.A., a montré, dès 1985, que l'injection de plasma de sujets vaccinés par le LPS de la souche J5 de E. Coli (structure commune à toutes les bactéries gram négatif, responsable du choc septique mais sans danger pour les sujets vaccinés) entraînait une réduction significative, non pas des infections bactériennes elles-mêmes, mais des chocs septiques et de la mortalité. Toutefois, des immunoglobulines intraveineuses (obtenues par fractionnement de Cohn et traitées à la pepsine à pH 4), n'ont pas montré leur efficacité dans le traitement des chocs (le travail de Baumgartner à Lausanne : colloque à Amsterdam, 1988). En revanche, dans les études expérimentales animales, des immunoglobulines préparées à partir de plasmas sélectionnés pour leur titre en anti-LPS ont pu prévenir l'infection bactérienne chez des animaux infectés (GAFFIN et al. : Vox Sanguinis 48, 276-83, 1985).

Toutefois, pour des raisons pratiques qui sont principalement dues à des difficultés d'approvisionnement, de stockage et d'administration, l'antisérum dirigé contre E. coli J5 n'est pas approprié pour une utilisation clinique à grande échelle. En revanche, une préparation d'immunoglobulines purifiées, obtenue à partir d'un pool de plasmas de volontaires naturellement immunisés, offrirait, elle, de nombreux avantages.

Tout d'abord, une telle préparation pourrait être disponible sous une forme lyophilisée, appropriée à une longue conservation. Enfin, l'administration de cette préparation par voie intraveineuse permettrait l'injection de quantité importante en produit actif avec une perte limitée dans l'organisme.

Le but de la présente invention est précisément de répondre à cet objectif. Il vise à élaborer des préparations riches en immunoglobulines spécifiques pour des utilisations thérapeutiques et utiles tout particulièrement pour prévenir le choc septique en clinique humaine.

La technique utilisée selon l'invention pour préparer ces anticorps anti-LPS, sous une forme purifiée, consiste en une chromatographie d'immunoaffinité et met en oeuvre une immobilisation d'antigènes LPS sur un support.

FEUILLE DE REMPLACEMENT

Des techniques de couplage d'antigènes LPS sur des supports ont certes déjà été décrites. Toutefois aucune d'entre elles n'est réellement satisfaisante.

Il a ainsi déjà été réalisé le couplage des antigènes LPS par l'intermédiaire de leurs fonctions hydroxyles sur des fonctions époxy du support. à pH très basique et donc dans des conditions dénaturantes pour les LPS, ce qui rend la capacité de tels supports très faible voire inexploitable. (R.B. FICK et al. J. of Immunol. Method. 38 : 103-116 (1980) ; J. FOX et al. Infection and Immunity 20, 3 867-868 (1978)).

De même, le couplage des antigènes LPS a été effectué par les fonctions amines du ligand sur un support activé comportant des fonctions cyanates et/ou imidocarbonates (gel sépharose activé au bromure de cyanogène). (E. RODAHL et al., Acta. pat. microbiol. immunol. scand. sect C, 92 : 247-254 (1984)). Or, les LPS contenant très peu de fonctions amines disponibles, ils se couplent difficilement à ce type de gel.

L'originalité de la technique utilisée selon la présente invention et décrite plus en détail ci-après permet, elle, d'assurer de manière efficace le couplage des antigènes LPS au support.

C'est pourquoi la présente invention concerne des anticorps purifiés spécifiquement dirigés contre les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries gram négatif, caractérisés en ce qu'ils sont purifiés à partir d'un milieu les contenant par une étape de chromatographie d'immunoaffinité utilisant des antigènes LPS insolubilisés, support d'immunoaffinité comportant essentiellement la fraction lipide A et le noyau des LPS communs à de nombreux lipopolysaccharides de bactéries gram négatif, et en ce que après séparation des anticorps par immunoaffinité on réalise un continuél enrichissement de ces anticorps pour obtenir une fraction riche en IgM.

Il peut s'agir d'anticorps purifiés spécifiquement dirigés contre les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries gram négatif, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus avec un facteur d'enrichissement supérieur à 500 et de préférence supérieur à 750, en réalisant une chromatographie d'immunoaffinité des anticorps anti-LPS présents dans des liquides biologiques, ladite chromatographie mettant en oeuvre la fixation desdits anticorps sur des antigènes LPS immobilisés sur un support.

Par facteur d'enrichissement, on entend désigner le rapport activité anticorps anti-LPS par mg ou g de protéines ou d'immunoglobulines de l'éluat sur activité anticorps anti-LPS par mg ou g de protéines ou d'immunoglobulines du liquide biologique d'origine.

5 Les milieux contenant ces anticorps sont de préférence des liquides biologiques qui peuvent être de sources variées en particulier des plasmas ou sérums humains ou encore des plasmas ou sérums d'animaux. Il peut s'agir en particulier de fractions enrichies en IgM, dans ce cas, l'étape de purification finale ne sera pas forcément nécessaire.

10 Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, les liquides biologiques utilisés ont été au préalable sélectionnés par une méthode ELISA pour leur spécificité anti-LPS. Cette méthode bien connue de l'homme du métier ne sera pas explicitée ici en détail.

15 La chromatographie par immunoaffinité mise en oeuvre selon l'invention repose donc sur l'utilisation d'antigènes LPS insolubilisés qui retiennent les immunoglobulines du mélange dirigées contre eux. Ces immunoglobulines sont ensuite récupérées après dissociation des complexes antigène-anticorps.

20 L'originalité de la technique proposée tient à la transformation des groupements hydroxyles du LPS en groupements aldéhydes très réactifs qui permettent un couplage soit directement sur une résine portant des fonctions hydrazines ou amines (aminohexyl sépharose, hydrazide d'acide adipique sépharose, lysine sépharose, gélatine sépharose) soit sur une protéine, par exemple l'albumine d'origine humaine ou animale, qui
25 sera elle-même couplée sur une résine activée, du sépharose activé au bromure de cyanogène par exemple.

Cette méthode a ainsi l'avantage de laisser accessible le lipide A des LPS, c'est-à-dire la partie antigénique commune à tous les LPS.

30 Les immunoglobulines présentes dans le liquide biologique à purifier sont donc retenues par ces antigènes LPS. Les anticorps fixés aux antigènes sont ensuite lavés de façon à éliminer la plupart des molécules ne reconnaissant pas l'antigène puis récupérés par dissociation des complexes antigène-anticorps.

35

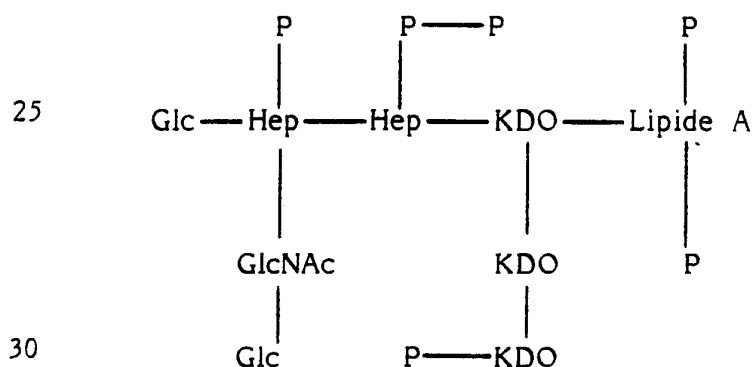
Cette étape de dissociation, l'élution, est une étape importante de l'immunopurification. L'élution est le plus souvent réalisée à l'aide d'un agent chimique, qui modifie les propriétés physico-chimiques de la solution, permettant ainsi la dissociation des complexes antigènes-anticorps, sans pour autant altérer les propriétés biologiques des antigènes et des anticorps spécifiques.

L'élution à pH acide est la plus utilisée. Le pH doit être suffisamment acide pour garantir un bon rendement d'élution mais pas trop acide pour ne pas être préjudiciable aux anticorps. Il sera de préférence de l'ordre de 2,5. On peut ainsi utiliser des tampons glycine-HCl et acétate de sodium.

De préférence, l'antigène LPS immobilisé sur le support provient d'un mutant d'une bactérie gram négatif, dépourvu de chaînes latérales polyosidiques et constitué uniquement de lipide A et d'un noyau commun à de nombreux lipopolysaccharides de bactéries de gram négatif. Ce mutant possède ainsi des propriétés antigéniques communes à de nombreux LPS.

Il peut ainsi s'agir du mutant J5 d'E. coli O 111 ou du mutant Re de Salmonella minnesota 595.

Selon un mode privilégié de l'invention, on utilise le mutant J5 dont la structure est la suivante :



Ce mutant J5 d'E.Coli ne présente pas de chaîne O-spécifique et, son nucleus est d'autre part simplifié. Il est de ce fait un déterminant antigénique commun à de nombreux LPS naturels et reconnaît les anticorps dirigés contre le lipide A et le noyau.

A la fin de la chromatographie par immunoaffinité, l'ensemble de l'activité anti-LPS se trouve alors concentré dans l'éluat : en une seule étape il est ainsi possible de purifier les anticorps d'un facteur d'environ 500 à 1 000 fois.

5 La présente invention concerne plus particulièrement les compositions à base d'IgM, notamment les IgM anti-LPS de bactéries gram négatif dirigés contre le fragment lipide A - noyau des LPS communs à de nombreux LPS de bactéries. En effet, les exemples suivants démontrent que l'activité thérapeutique est essentiellement portée par les IgM.

10 Compte tenu de leur pureté protéique, les anticorps anti-LPS, objets de la présente invention peuvent être administrés à l'animal et/ou 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 chocs endotoxiniques.

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

Les exemples et figures donnés ci-après, à titre non limitatif, permettront de mettre en évidence d'autres caractéristiques et avantages
20 de la présente invention.

La figure 1 décrit l'activité anti-LPS d'un concentré d'anticorps anti-LPS purifiés, objet de la présente invention.

Exemple 1 : Immunopurification d'anticorps anti-LPS

25

1) Matériel et méthodes

1.1. Préparation du support

30 La réactivité chimique des LPS a été rendue possible par clivage oxydatif au periodate de sodium des alphadiols portés par le KDO (le trisaccharide 2-ceto-3-désoxyoctonate, reliant le nucléus et le lipide A) et les oses du nucléus (heptose et glucose), avec formation de fonctions aldéhydes (réaction de Malprade). Ces fonctions aldéhydes peuvent se condenser sur des fonctions amines ou hydrazines (réaction de Schiff)
35 provenant soit d'un support chromatographique (par exemple hydrazide

Sépharose), soit d'une protéine (albumine sérique bovine). La fonction imine formée peut être ensuite stabilisée par réduction au borohydrure de sodium ou au cyanoborohydrure de sodium.

5 a) Activation des LPS E.Coli J5

Dans un tube Falcon 50 ml (Becton Dickinson) en polypropylène, sont introduits successivement 35 mg de LPS E. Coli J5 (List Biological Laboratories) en solution dans de l'eau pour préparations injectables (soit environ 8 micromoles) et 0,35 ml d'une solution de 2,15 g
10 de NaIO_4 dans 100 ml d'eau PPI (soit 35 micromoles). Le tube est ensuite agité 24 heures, dans l'obscurité et à température ambiante.

b) Couplage des LPS sur gel d'Hydrazide d'Acide Adipique-Sépharose

25 ml de gel sont lavés sur verre fritté avec dans un premier
15 temps, 1 litre d'eau PPI, puis 500 ml de tampon acétate 100 mM pH5. Dans un flacon de 250 ml en verre, on introduit le gel lavé et essoré, les 11 ml de la solution de LPS activés et environ 80 ml de tampon acétate. Le tube est agité 24 heures, à température ambiante dans l'obscurité.

Le gel est ensuite essoré et lavé sur verre fritté successive-
20 ment avec 200 ml de tampon acétate et 200 ml d'une solution de NaCl 2M puis équilibré en tampon phosphate 100 mM pH 7,5.

1.2. Essai d'immunopurification

25 a) Chromatographie

L'essai a été réalisé sur une colonne IBF 25 contenant 30 ml de gel susmentionné. Outre la colonne, le système chromatographique se compose de :

- une pompe péristaltique (Gilson, type minipuls 2),
- 30 • un détecteur UV, DO : 280 nm (Pharmacia, S.P.M. UV-1), équipé d'une cellule HR-10,
- un enregistreur (Pharmacia, REC-482).

Avant l'injection de la source d'anticorps dans la colonne, un essai à blanc est effectué :

35

FEUILLE DE REMPLACEMENT

- . lavage du gel avec 150 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7,5,
- . lavage du gel avec 150 ml de tampon glycine-HCl 0,1 M pH 2,5,
- . rééquilibrage du gel avec 150 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7,5.

La source à purifier est du plasma humain (600 ml) sélectionné
5 par méthode ELISA pour sa spécificité anti-LPS. Ce plasma est dilué au
demi dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,5 (soit 1 200 ml total).

Les 1 200 ml de plasma dilué (25 g/l^{-1} de protéines, titre en
ELISA au $1/53^e$) ont été injectés dans la colonne à un débit de 60 ml par
heure, assurant un temps de séjour de 30 minutes. Après lavage avec du
10 tampon phosphate 0,1 M pH 7,5, les anticorps spécifiques sont élués par du
tampon glycine-HCl pH 2,5. L'éluat est neutralisé extemporanément avec
5 ml de tampon phosphate 0,5 M pH 7,5.

b) Suivi analytique

- 15 - Dosages des classes d'immunoglobulines G, M et A dans l'éluat.

Ils sont effectués par néphélémétrie.

On utilise un analyseur immunochimique (Immunochemistry
Analyser ICS-II Beckman). Cet appareil mesure l'intensité de la lumière
déviée par des particules en suspension dans une cellule de détection. Ces
20 particules proviennent de la réaction d'immunoprécipitation entre
l'antigène que l'on veut doser, et l'anticorps. Selon le calibrateur et
l'anticorps utilisés, on peut doser les classes d'immunoglobulines humaines,
G, A, ou M, l'albumine ou la transferrine humaines. La précision est de
l'ordre de 5 % au centre de la gamme, de 10 % aux faibles concentrations.

- 25 - Dosage de la concentration protéique de l'éluat.

La concentration a été évaluée à l'aide du dosage par BCA
(acide bicinchoninique) (Kit PIERCE).

Selon le principe de cette méthode, les protéines provoquent
en milieu alcalin la réduction de l'ion cuivrique (Cu^{2+}) selon la réaction du
30 Biuret. La réaction entre le sel de sodium de l'acide bicinchoninique (BCA)
et l'ion cuivreux est sensible et très spécifique. Le complexe formé
 BCA-Cu^+ est soluble dans l'eau et montre une forte absorbance à 562 nm.

Le dosage est réalisé de la manière suivante :

- 35 . 1 part de solution à 4 % de sulfate de cuivre et 50 parts d'une solution de
carbonate, bicarbonate, tartrate de sodium, de réactif BCA dans NaOH

0,2 M sont ajoutés à 0,1 ml de solution à doser ou 0,1 ml de tampon de dilution des échantillons pour le blanc + 2 ml de réactif, l'ensemble est agité, incubé 2 heures à température ambiante ou 30 minutes à 37°C puis révélé à 562 nm contre le blanc de lecture ;

- 5 . chaque échantillon est dosé en triple ; on réalise une gamme étalon de SAB (Pierce) et d'une préparation d'immunoglobulines humaines de 0,05 à 1 mg/ml.

10 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 4/30 (Pharmacia) en présence de SDS

- Dosage de l'activité anti-LPS dans la source, le filtrat et l'éluat
Il a été réalisé comme suit:

- 15 . adsorber pendant 16 heures à température ambiante sur les puits de plaques de microtitration en PVC (Falcon réf. 3912, Becton Dickinson), les LPS E.Coli J5 (List Biological Laboratories) à raison de 0,1 ml par puits d'une solution de LPS à 10 µg/ml dans du PBS contenant 1,6% (p/v) de $MgCl_2$ et 0,01% (p/v) de merthiolate;
- 20 . après 3 lavages avec une solution à 0,9% NaCl (p/v) et 0,1% tween 20 (v/v), les puits sont saturés pendant 1 heure à température ambiante avec 150 µl d'une solution d'albumine sérique bovine à 5% (p/v) dans du PBS.
- . après 3 lavages avec une solution à 0,9% NaCl (p/v) et 0,1% tween 20 (v/v), incuber 3 heures à 37°C les échantillons à doser à différentes dilutions dans du PBS à 5% (p/v) d'albumine sérique bovine.
- 25 . après 5 lavages avec une solution à 0,9% NaCl (p/v) et 0,1% tween 20 (v/v), incuber 90 minutes à 37°C avec 100 µl d'une solution d'immunoglobulines de chèvre anti-immunoglobulines G + M humaines couplées à la peroxydase, diluées au 1/400 000 dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,5 avec 0,1% d'albumine sérique bovine.
- 30 . après 5 lavages avec une solution à 0,9% NaCl (p/v) et 0,1% tween 20 (v/v), l'activité enzymatique est révélée par addition d'orthophénylène diamine dans H_2O_2 0,03% (Diagnostics Pasteur) pendant 20 minutes à température ambiante en l'absence de lumière (100 µl de substrat par puits); la réaction enzymatique est arrêtée par ajout de H_2SO_4 4N (50 µl par puits). La densité optique de chaque puits est déterminée à 492 nm, à
- 35 l'aide d'un lecteur de microplaque ELISA (Molecular Devices, Vmax).

2) Résultats

Le tableau I présenté ci-après et la figure 1 rendent compte des résultats obtenus.

5

TABLEAU I

10	CONCENTRATION (g/l)	
15	- Protéines (BCA)	0,61
	- IgG (néphélémétrie)	0,26
20	- IgM (néphélémétrie)	0,33
	- IgA (néphélémétrie)	0,04
25	- Ig totales (IgG + IgM + IgA)	0,63
30	TITRE	1/1050 ^e
35	PURETE ELECTROPHORETIQUE des Ig totales	90%

Les concentrations protéiques, correspondant au titre (dilution de l'échantillon qui donne un signal égal à la moitié de la densité optique maximale, soit $1,3/2 = 0,65$) du plasma de départ et de l'éluat, sont respectivement de :

5

$$\frac{0,1\text{ml} \times 25 \text{ mg/ml}}{53} = 0,0472 \text{ mg} \\ = 47,2 \text{ } \mu\text{g}$$

10

$$\frac{0,1\text{ml} \times 0,63\text{mg/ml}}{1\ 050} = 0,00006 \text{ mg} \\ = 60 \text{ ng}$$

soit une "différence" de 47 200 mg

15

$$\frac{\text{-----}}{60 \text{ mg}} = 787;$$

cette valeur peut être assimilée à un coefficient d'enrichissement.

On peut évaluer le rendement de la purification par le biais du rapport :

20

$$\frac{(\text{titre} \times \text{volume}) \text{ éluat}}{(\text{titre} \times \text{volume}) \text{ plasma de départ}} \times 100$$

25

$$\text{soit } 1\ 050 \times 30 \\ \frac{\text{-----}}{53 \times 1\ 200} \times 100 \neq 50\%$$

30

D'une part cette valeur est toute relative, d'autre part la perte en anticorps n'est pas dramatique, dans la mesure où elle est due principalement aux anticorps de faible affinité, peu intéressants pour les applications envisagées.

35

Exemple 2 : Préparation et caractérisation d'un mélange concentré d'IgG et d'IgM plasmatiques humains dirigés contre les LPS

1) Matériel et méthodes

1.1. Préparation d'un mélange IgG/IgM anti-LPS

Vingt quatre éluats d'immunopurification sont décongelés à température ambiante. Le mélange est ensuite soumis à une diafiltration sur membrane YM 100 (76 mm de diamètre, seuil de coupure 100 kD), (AMICON) avec du tampon phosphate 20 mM pH7 contenant 0,9 % (p/v) de NaCl. Lorsque le volume total du mélange se trouve abaissé à une valeur d'environ 40 ml, celui-ci est prélevé et filtré successivement sur filtre Minisart 5µm puis 0,22 µm (SARTORIUS).

Comme décrit précédemment, les classes d'immunoglobulines G, M et A sont dosées par néphélémétrie à l'aide d'un analyseur immunochimique Beckman ICS-11.

1.2. Caractérisation en ELISA du mélange IgG/IgM anti LPS

La spécificité du mélange immunopurifié et concentré d'immunoglobulines polyclonales humaines anti LPS a été évaluée en ELISA, en comparaison avec celle des immunoglobulines polyvalentes intraveineuses obtenues par fractionnement de Kistler-Nichmann modifié, de pools plasmatiques d'au moins 1000 donneur de sang (Polygamma de Bio Transfusion, France), vis-à-vis du LPS de E Coli JS (Eurobio) et d'autres bactéries gram négatif : E Coli O111 : B 4, Salmonella Minnesota R5, Klebsiella Pneumoniae, Pseudomonas Aeruginosa (Sigma).

Le protocole utilisé pour ces évaluations est identique à celui décrit précédemment (exemple 1).

2) Résultats

La concentration des classes IgG, IgM et IgA dans le mélange anti-LPS est de 6,1, 3,1, et 0,9 g/l respectivement.

Le mélange anti-LPS reconnaît les LPS des 4 souches sauvages testées (Tableau 2). Les titres mesurés pour les LPS des souches sauvages sont un peu plus faibles que celui obtenu vis-à-vis de la souche mutante E

Coli J5. Ceci s'explique, d'une part par le mode de préparation de ces anticorps, immunopurifiés sur E Coli J5 immobilisés, d'autre part par le fait que ces anticorps ne peuvent se fixer que sur le noyau des LPS, lequel se trouve plus ou moins accessible en fonction de l'importance des chaînes latérales polyosidiques sur les LPS des souches sauvages.

TABLEAU 2

LPS	Concentrations protéiques nC ₅₀ correspondant au titre, donnant un signal égal à la moitié de la densité optique maximale (n = nombre de sites de liaison avec l'antigène).		Enrichissement =
	nC ₅₀ de la Polygamma (mg/l-1)	nC ₅₀ du mélange (mg/l-1)	Rapport $\frac{\text{nC}_{50} \text{ Polygamma}}{\text{nC}_{50} \text{ mélange}}$
E. Coli J5	333	3	111,0
E. Coli 0111 : B4	125	17	7,4
S. Minnesota R5	333	10	33,3
K. Pneumoniae	250	10	25,0
P. Aeruginosa	833	20	41,7

Le produit Polygamma reconnaît également les LPS des souches utilisées ; mais dans le cas présent tous les anticorps sont pris en compte, à la fois ceux dirigés contre le noyau et ceux dirigés contre les chaînes latérales.

5 Malgré la perte supposée des anticorps dirigés contre les chaînes latérales des LPS lors de l'étape d'immunopurification sur E Coli J5 immobilisés, un enrichissement en activité anti-LPS peut être constaté dans le mélange par rapport au produit Polygamma. Cet enrichissement est bien
10 entendu mis en évidence pour le LPS de E Coli J5 mais aussi pour ceux de Salmonella Minnesota R5, Klebsiella Pneumoniae et Pseudomonas Aeruginosa, et dans une proportion plus modeste pour le LPS de E Coli 0111 : B4, souche pour laquelle la réponse anticorps naturelle chez l'homme semble plus significativement dirigée contre les chaînes latérales.

15 Exemple 3 : Activité pharmacologique in vitro du mélange concentré
IgG/IgM anti-LPS

1/ Détermination de l'activité anti-LPS du mélange immuno-
20 purification IgG/IgM à l'aide d'un essai d'inhibition de multiplication de virus bactériophages

1.1.) Matériel et méthodes

25 Le virus bactériophage ϕ X 174 tient son infectivité vis-à-vis de l'hôte E Coli de la reconnaissance spécifique des lipopolysaccharides des parois de E Coli en présence d'ions Ca^{2+} (A.M. FIELD, E. ROWAIT et R.J.P. WILLIAMS in Biochem J. 263, 695-702 (1989). Nous avons donc mis en oeuvre cette propriété dans un essai d'inhibition de multiplication des virus
30 ϕ X 174 en ajoutant des immunoglobulines ayant un titre anti-LPS de E Coli. Le titrage des phages est réalisé par dilutions décimales du stock primaire de virus dans le diluant contenant la souche sensible. Les dilutions sont mises à incuber en présence de gélose de surface liquide, puis versées sur les boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive en profondeur.

35 Après incubation 18 à 24h à 37°C, les boîtes sont lues selon le nombre de plages de lyse obtenues.

Les titres sont exprimés en unités formant plages (UFP/ml).

L'activité du mélange immunopurifié concentré IgG/IgM anti-LPS (cf exemple 2) a été évaluée sur ce modèle en comparaison avec celle des immunoglobulines polyvalentes intraveineuses (Polygamma de BIO Transfusion).

1.2.) Résultats

Par rapport au titre initial de virus dans le stock primaire (6×10^7 UFP/ml) on constate un effet inhibiteur de multiplication de 3,14 Log pour une solution à 10 mg/ml d'immunoglobulines non spécifiques.

L'effet inhibiteur s'estompe avec la dilution, puisqu'à 0,625 mg/ml on ne mesure plus qu'une différence de 1,48 Log (tableau 3).

TABLEAU 3

Inhibition de la Multiplication de ϕ X 174
en fonction de la concentration en Polygamma

Concentration en Polygamma (mg/ml)	Titre : (N) en UFP/ml	Log N
10	4,50 10^4	4,65
5	1,00 10^5	5,00
2,5	1,50 10^5	5,18
1,25	1,42 10^6	6,15
0,625	2,04 10^6	6,31

L'activité inhibitrice de la multiplication des phages ϕ x 174 en fonction de la concentration du mélange de IgG/IgM anti LPS est exprimée dans le tableau 4.

TABLEAU 4

Inhibition de la multiplication de ϕ x 174
en fonction de la concentration en mélange IgG/IgM anti-LPS

Concentration en mélange IgG/IgM anti-LPS (mg/ml)	Titre (N) en UFP/ml	log N
10	2,85 10^3	3,45
5	5,55 10^3	3,74
2,5	6,80 10^3	3,83
1,25	1,13 10^4	4,05
0,625	2,34 10^4	4,37

FEUILLE DE REMPLACEMENT

L'effet inhibiteur est très significativement plus important dans le cas du mélange immunopurifié IgG/IgM anti-LPS que dans celui du produit Polygamma, en particulier aux concentrations 1,25 mg/ml et 0,625 mg/ml où la différence d'activité est d'un ordre de 100 (2 log) ; Ainsi une
5 activité anti LPS supportée par des anticorps se trouve beaucoup plus concentrée dans le mélange immunopurifié que dans les immunoglobulines polyvalentes intraveineuses (Polygamma) ; ladite activité se traduit par une fixation des anticorps sur les LPS des parois des bactéries en culture, fixation très préjudiciable à la reconnaissance de la paroi bactérienne par
10 le phage.

2/ Détermination de l'activité anti-LPS du mélange immunopurifié IgG/IgM, à l'aide d'un essai d'inhibition de la sécrétion de $\text{TNF}\alpha$ par des macrophages péritoneaux murins sensibilisés aux LPS.

15

2.1.) Matériel et méthodes

Sous l'action des endotoxines bactériennes, les monocytes/macrophages sécrètent du TNF et d'autres monokynes (IL1 , IL6 ...) ; le TNF
20 est donc un bon marqueur de l'action des endotoxines.

Les macrophages péritonéaux murins sont prélevés chez 3 souris BALB/C ayant reçu 7 jours auparavant 0,5 ml d'adjuvant complet de Freund par voie intrapéritonéale. Ainsi, 5 ml de milieu complet RPMI 1640 supplémenté en glutamine, antibiotiques et ultrose HY 1 % (v/v) (IBF) sont
25 injectés dans la cavité péritonéale de chaque souris, puis réaspirés et mélangés.

Après 3 lavages en milieu de Hanks, le culot cellulaire est remis en suspension dans le milieu complet. On obtient environ 150 millions de cellules dont 60 millions de macrophages. Une solution ajustée à
30 10^6 macrophages par ml ($2,5 \cdot 10^6$ cellules péritonéales/ml) dans le milieu complet est préparée, 100 μl de cette solution sont distribués dans des puits de microplaques (96 puits). Après incubation 3 heures à 37°C dans l'incubateur à CO_2 , les surnageants sont éliminés : seuls les macrophages restent adsorbés sur le fond des micropuits. On ajoute alors 100 μl
35 d'anticorps à tester (ou 100 μl de milieu complet seul) dilués dans le milieu

FEUILLE DE REMPLACEMENT

complet puis 100 µl de LPS dilués également dans le milieu complet. Trois puits sont consacrés par dilution d'anticorps et par dilution de LPS.

Après 24 heures d'incubation, les surnageants sont prélevés : les 3 surnageants de chaque "situation" sont mélangés pour disposer ainsi d'assez de volume pour être dosés en ELISA. Les surnageants sont ensuite congelés à -40°C et le dosage du TNF alpha est réalisé en différé. Le dosage du TNF alpha murin est réalisé à l'aide du lait ELISA produit par les Laboratoires GENZYME et commercialisé par la société TEBU. Il s'agit d'un dosage de type sandwich avec un anticorps monoclonal de hamster anti-TNF alpha murin adsorbé sur les microplaques. Après incubation avec le TNF alpha, on incube avec des anticorps polyclonaux de chèvre anti-TNF alpha murin. Enfin, après incubation avec des anticorps polyclonaux d'âne anti-immunoglobulines de chèvre marqués à la peroxydase, les immuno-complexes sont révélés par l'action de la peroxydase sur de l'orthophénylène diamine et lecture de la densité optique à 492 nm.

Deux souches de LPS ont été utilisées : le LPS de E. Coli J5 et le LPS de E. Coli 055 = B5 (souche sauvage).

La préparation d'anticorps IgG/IgM immunopurifiés anti-LPS a été évaluée quant à son pouvoir d'inhiber la sécrétion de TNF par les macrophages sensibilisés aux LPS susmentionnés, en comparaison avec le produit Polygamma (Bio Transfusion).

2.2.) Résultats

Les résultats obtenus sont résumés figure 2 pour le mélange anti-LPS et figure 3 pour le Polygamma (symbolisée par GVP pour gamma polyvalentes intraveineuses).

Le mélange anti-LPS inhibe très significativement et de manière dose dépendante l'action du LPS de E. Coli J5 comme celle du E. Coli 055 = B5.

Ainsi ces anticorps immunopurifiés sur E. Coli J5 immobilisés (souche mutante dépourvue de chaînes latérales) sont capables de neutraliser très efficacement dans un système d'évaluation biologique in vitro l'action de LPS de souches sauvages. Ces anticorps montrent ainsi clairement leur intérêt potentiel pour la prévention et/ou le traitement du choc endotoxinique.

En revanche, le produit Polygamma n'inhibe que partiellement l'action des LPS, et ce à des doses au moins 100 fois supérieures à celles du mélange immunopurifié anti-LPS.

Exemple 4 : Préparation et caractérisation d'un concentré d'IgM
plasmatiques humaines et d'un concentré d'IgG plasmatiques
humaines, dirigée contre les LPS

5 1) Matériel et méthodes

1.1. Préparation de chacun des 2 concentrés

Le mélange concentré d'IgM/IgG obtenu et décrit précédemment (exemple 2) est reconcentré dans un volume de 4 ml avant d'être
10 chromatographié par tamisage moléculaire sur gel ACA 34 (IBF). Les classes d'immunoglobulines (G, M, A) sont dosées en néphélométrie.

1.2. Caractérisation en ELISA de chacune des préparations IgM et IgG
anti-LPS

15 La spécificité des deux fractions a été évaluée en ELISA, en comparaison avec celle du mélange initial immunopurifié IgG/IgM anti-LPS et avec celle des immunoglobulines polyvalentes intraveineuses (Polygamma de Bio Transfusion), vis-à-vis du LPS de E. Coli J5 (Eurobio) et d'autres bactéries gram négatif : E. Coli 0111 : B4, Salmonella Minnesota R5,
20 Klebsiella Pneumoniae, Pseudomonas Aeruginosa (Sigma). Le protocole utilisé pour ces évaluations est identique à celui décrit précédemment (exemple 1).

2) Résultats

25 Les concentrations des concentrés IgM et IgG anti-LPS en IgM, IgG et IgA sont de 9, 0,7 et 1 g/l pour le concentré en IgM, et 0,8, 12,5 et 0,4 g/l pour le concentré en IgG.

Les IgM et les IgG anti-LPS préparés reconnaissent en ELISA les LPS des 4 souches sauvages testées. En apparence, les IgG semblent
30 montrer un titre un peu plus important, mais compte tenu du fait que les IgM ne peuvent pas se lier à l'antigène adsorbé sur phase solide par tous ses sites de liaison, il est difficile de tirer une conclusion plus précise.

35

Exemple 5 : Détermination de l'activité anti-LPS de préparations d'IgM
plasmatiques humaines et d'IgG plasmatiques humaines
dirigés contre les LPS

5 Le protocole utilisé est identique à celui exposé dans
l'exemple 3 (2.1).

Deux souches de LPS ont été utilisées dans ce modèle : le LPS
de E. Coli J5 et le LPS de E. Coli 055 : B5.

10 Les résultats obtenus sont résumés figure 4 (IgM) et figure 5
(IgG).

La préparation d'IgM anti-LPS inhibe très significativement et
de manière dose dépendante l'action des LPS E. Coli J5 et E. Coli 055 : B5.
Les IgM anti-LPS sont ainsi capables de neutraliser très efficacement dans
un système d'évaluation biologique in vitro l'action de LPS de souches
15 sauvages. Les IgM montrent ainsi clairement leur intérêt potentiel pour la
prévention et/ou le traitement du choc endotoxinique.

En revanche, la préparation d'IgG anti-LPS n'inhibe que
partiellement l'action des LPS. Peut-être même les IgM résiduelles
pourraient expliquer partiellement, voire totalement l'effet de la
20 préparation d'IgG.

Ainsi l'activité neutralisante des IgM polyclonales anti-LPS est
très supérieure à celle des IgG polyclonales, peut-être en raison du poids
moléculaire important des IgM et des nombreux sites de fixation de
l'antigène présents sur l'IgM, permettant ainsi à l'IgM de piéger
25 efficacement les LPS qui sont des structures assez volumineuses.

30

35

FEUILLE DE REMPLACEMENT

REVENDICATIONS

1. Anticorps purifiés spécifiquement dirigés contre les
5 lipopolysaccharides (LPS) des bactéries gram négatif, caractérisés en ce
qu'ils sont purifiés à partir d'un milieu les contenant par une étape de
chromatographie d'immunoaffinité utilisant des antigènes LPS insolubilisés,
support d'immunoaffinité comportant essentiellement la fraction lipide A
et le noyau des LPS communs à de nombreux lipopolysaccharides de
10 bactéries gram négatif, et en ce que après séparation des anticorps par
immunoaffinité on réalise un continuél enrichissement de ces anticorps pour
obtenir une fraction riche en IgM.

2. Anticorps purifiés selon la revendication 1, caractérisés en
ce que les antigènes LPS sont immobilisés sur un support de manière à
15 laisser accessible leur lipide A auxdits anticorps.

3. Anticorps purifiés selon la revendication 1 ou 2, caractérisés
en ce que les antigènes LPS sont liés au support par couplage de leurs
fonctions aldéhydes, issues de la transformation de leurs fonctions
hydroxyles, avec des fonctions hydrazines ou amines.

20 4. Anticorps purifiés selon l'une quelconque des revendications
1 à 3, caractérisés en ce que les antigènes sont couplés soit directement sur
une résine portant des fonctions hydrazines ou amines, soit sur les fonctions
amines d'une protéine, elle-même liée à un support.

5. Anticorps purifiés selon la revendication 4, caractérisés en
25 ce que l'antigène LPS est couplé à du gel d'agarose sur lequel sont fixées
des fonctions hydrazines ou amines..

6. Anticorps selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisés
en ce que l'antigène LPS utilisé provient d'un mutant d'une bactérie gram
négatif dépourvu de chaînes latérales polyosidiques et constitué uniquement
30 de lipide A et d'un noyau commun à de nombreux lipopolysaccharides.

7. Anticorps selon la revendication 6, caractérisés en ce que
l'antigène LPS provient du mutant J5 d'E. coli 0111.

8. Anticorps selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisés en ce que les liquides biologiques sont des plasmas ou sérums humains ou des plasmas ou sérums d'animaux.

5 9. Anticorps selon les revendications 1 à 8, caractérisés en ce que les liquides biologiques comportent une activité anti-LPS.

10. Anticorps selon les revendications 1 à 9, caractérisés en ce qu'il s'agit d'un mélange d'IgM, IgG et/ou IgA.

11. Anticorps selon les revendications 1 à 10, caractérisés en ce qu'il s'agit de IgM.

10 12. Anticorps selon les revendications 1 à 11, caractérisés en ce qu'ils présentent une pureté protéique supérieure ou égale à 50 %.

13. Anticorps selon les revendications 1 à 12, utiles pour la prévention ou le traitement des chocs endotoxiniques.

15 14. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient au moins des anticorps selon l'une des revendications 1 à 13.

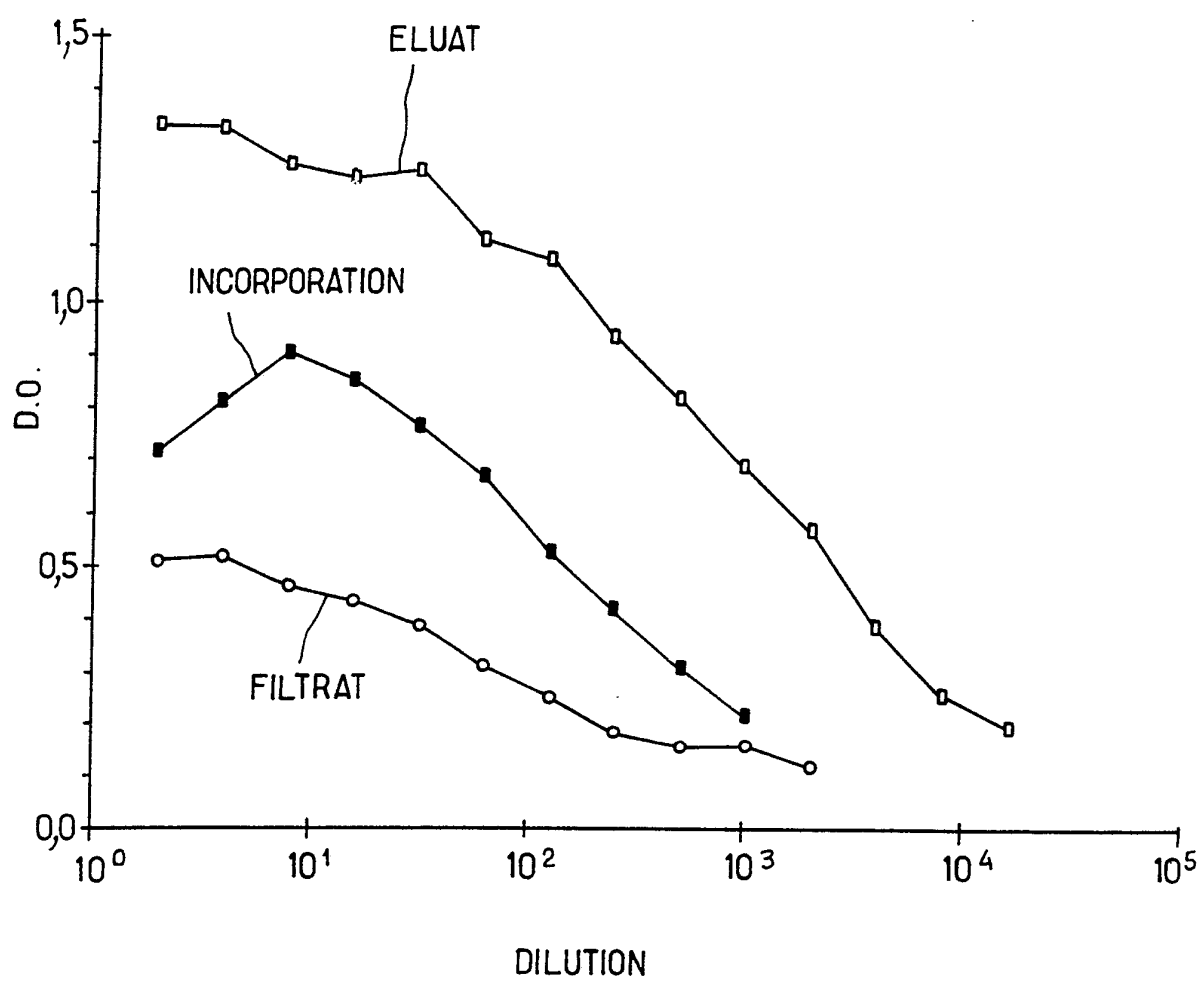
20

25

30

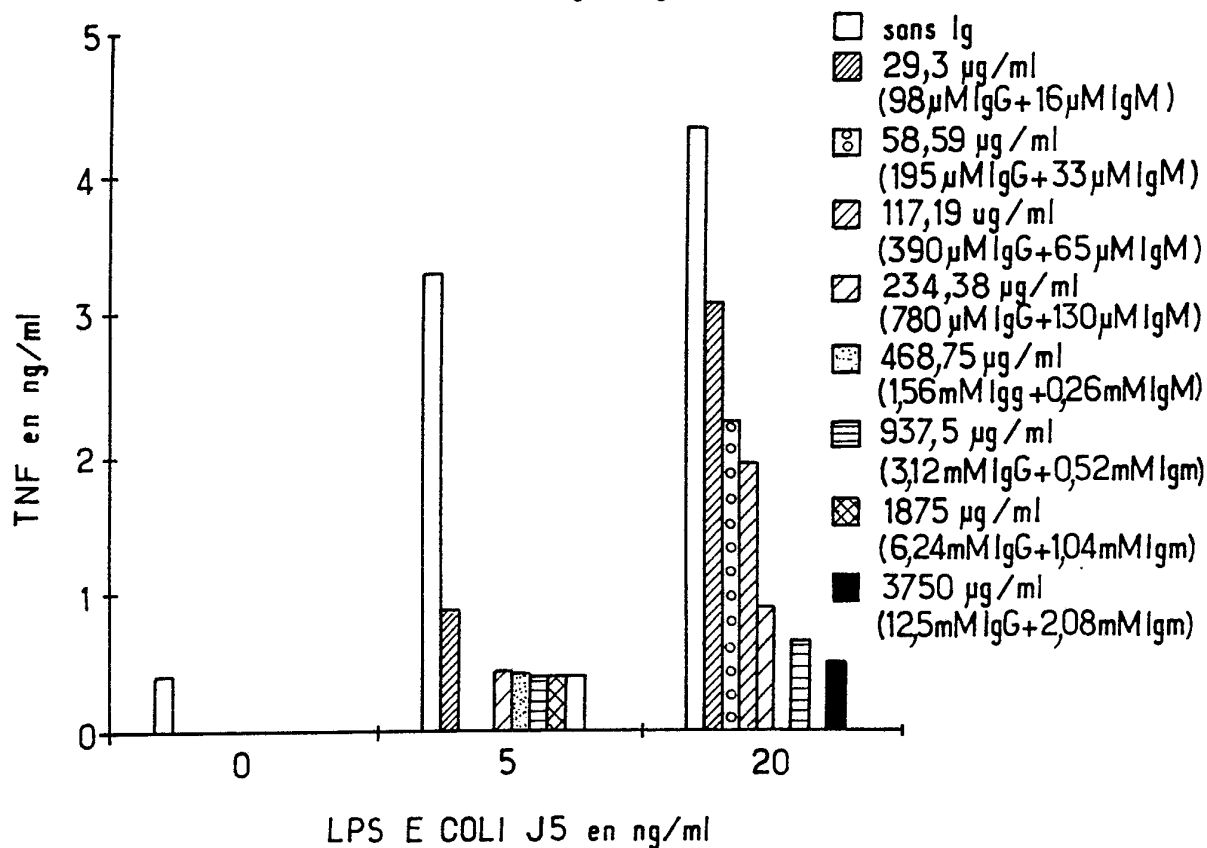
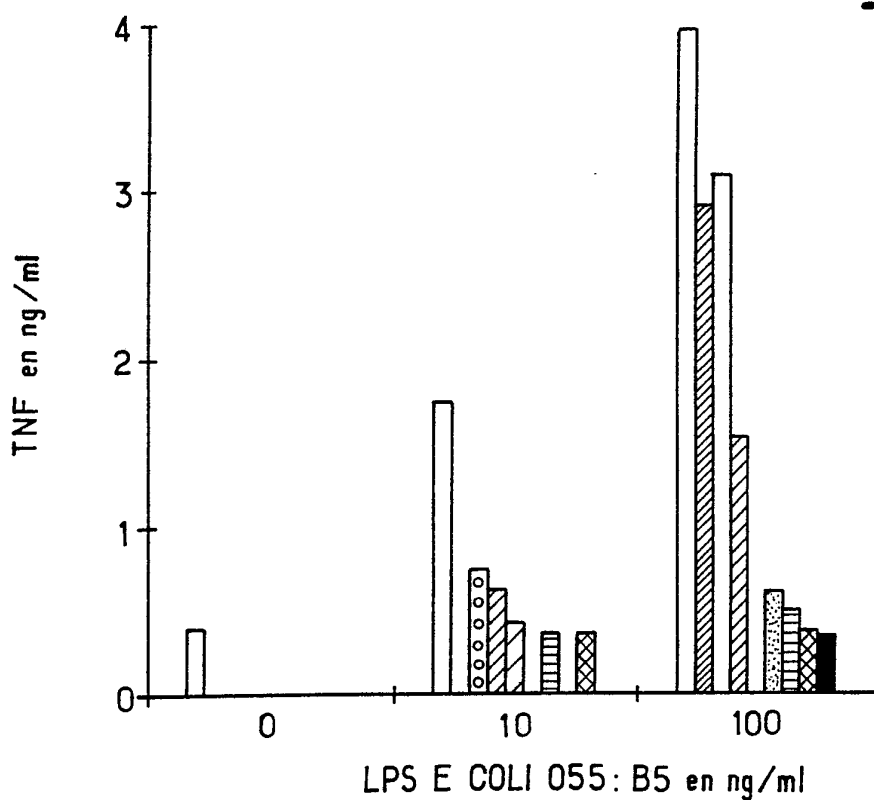
35

1 / 5

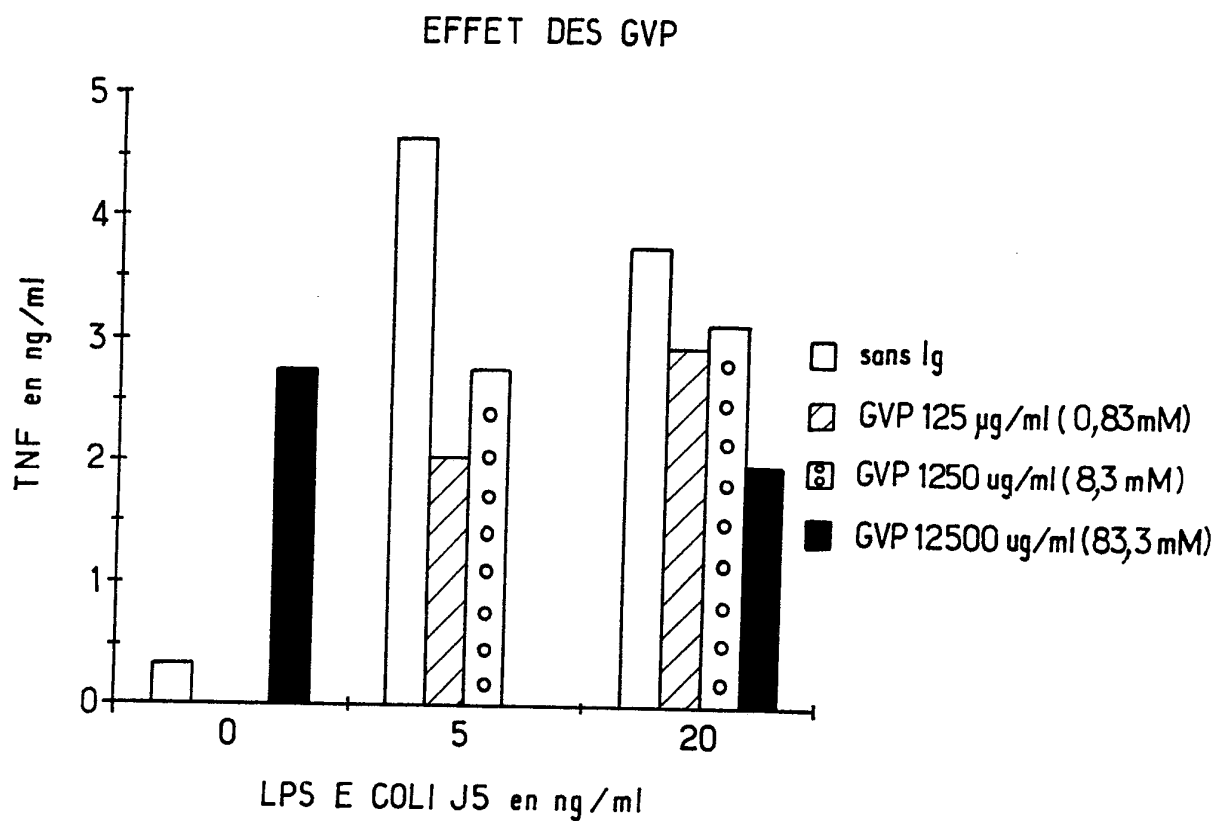
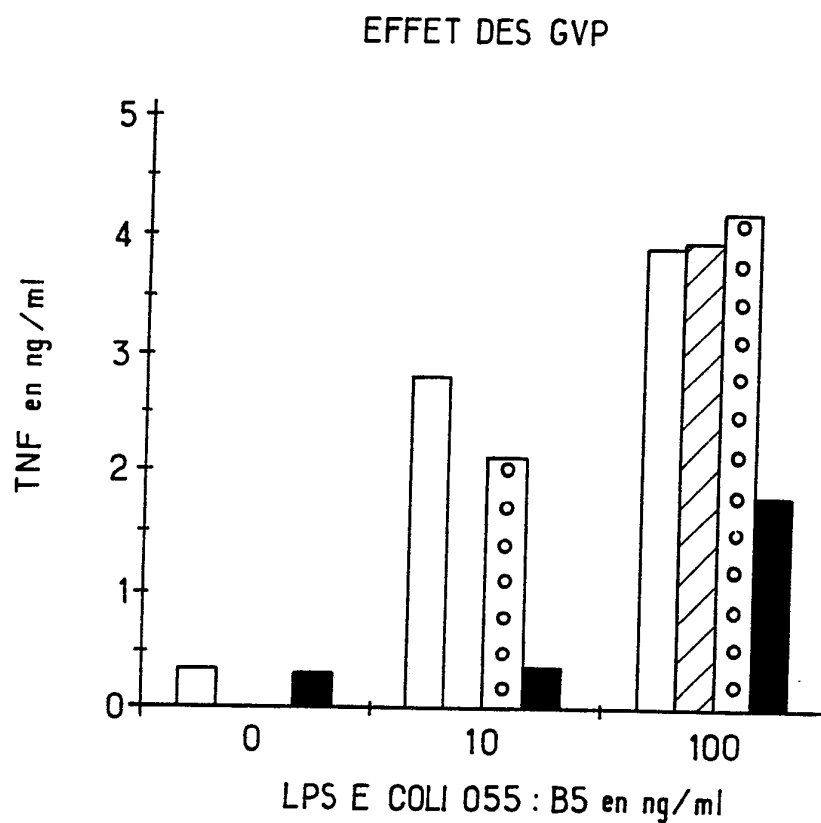
**FIG.1****FEUILLE DE REMPLACEMENT**

2 / 5

EFFET DU MELANGE (IgG + IgM) ANTI LPS

**FIG. 2**

3 / 5

FIG. 3

4/5
EFFET DES IgM

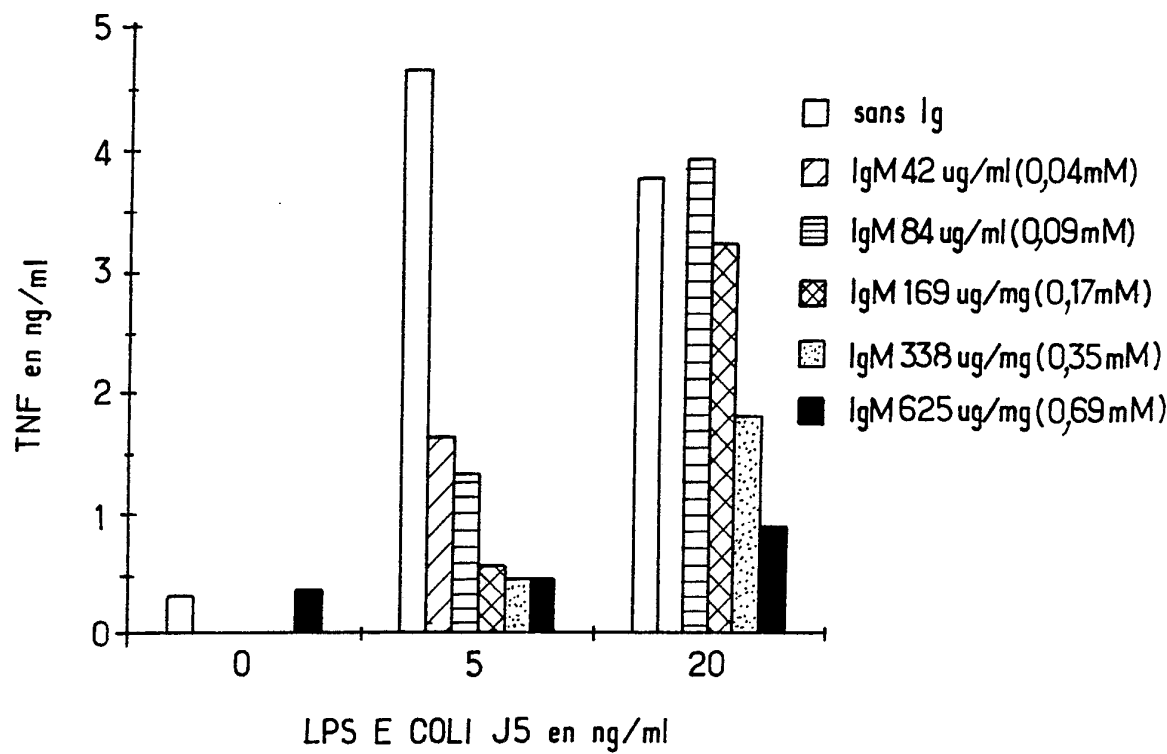
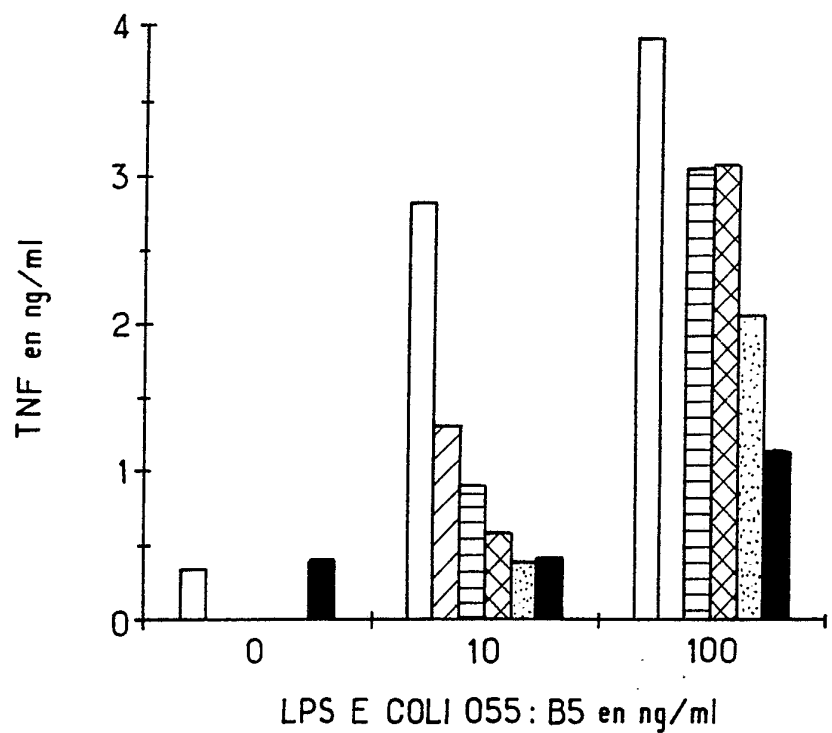
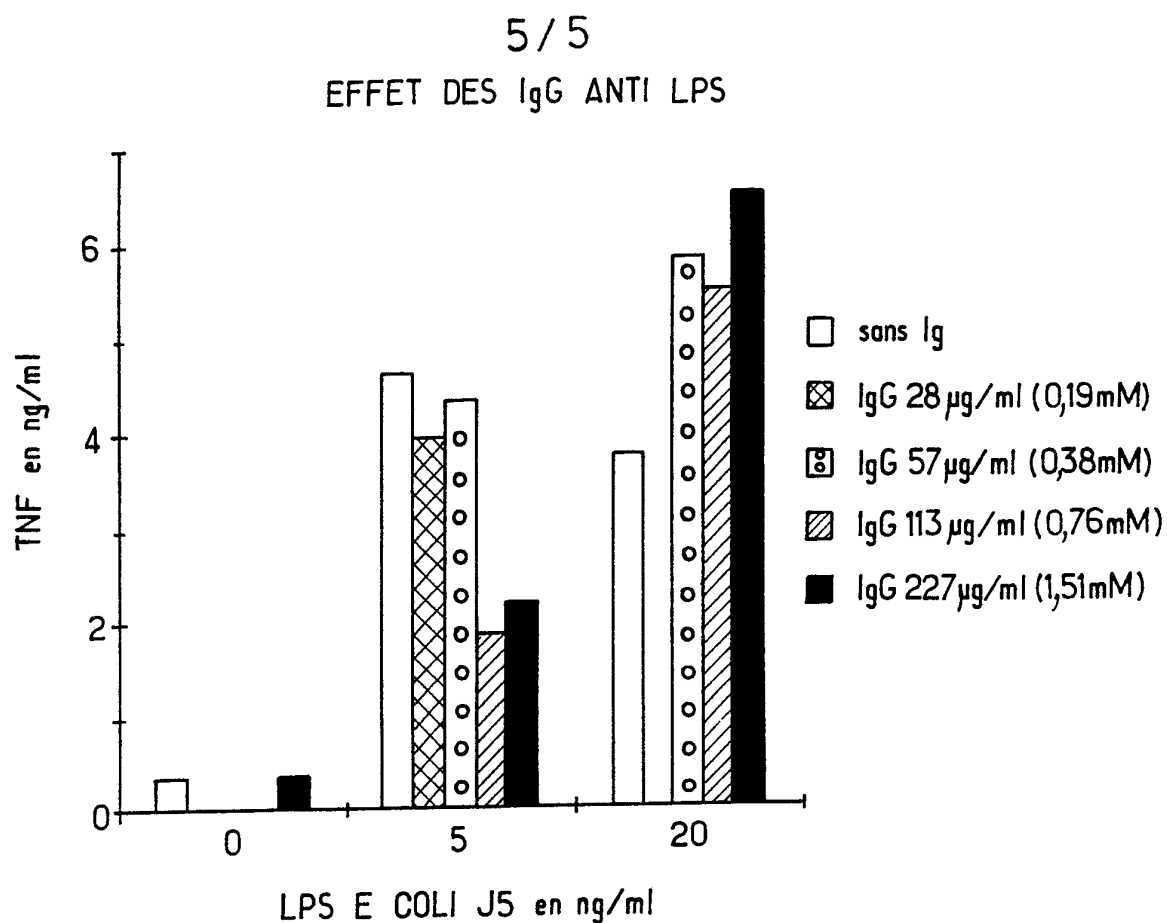
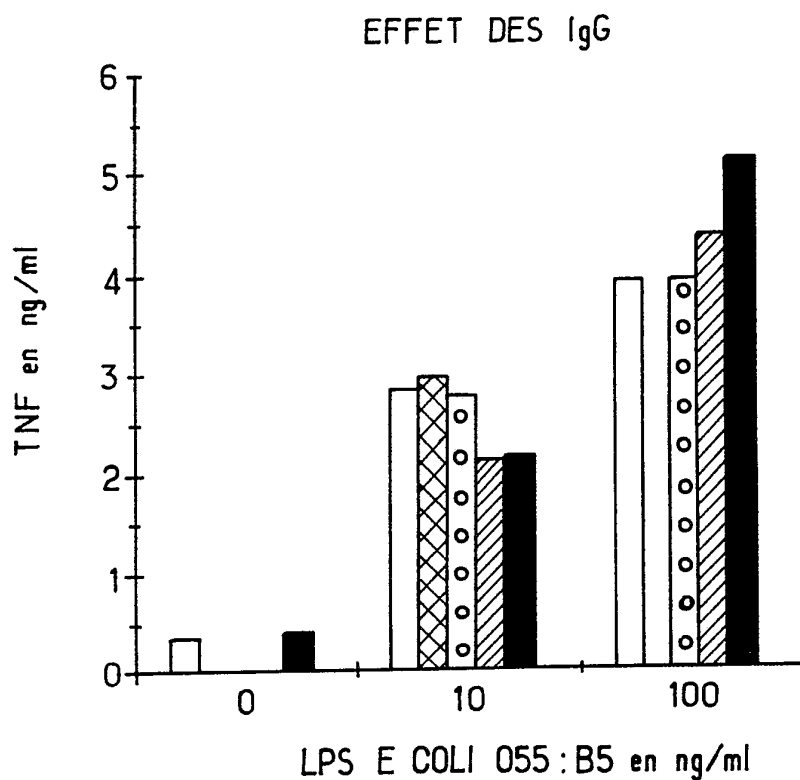


FIG. 4

EFFET DES IgM



**FIG. 5**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR91/00266

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl.5 A61K 39/40		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl.5	A61K	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category ¹⁰	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	Diagn Microbiol Infect Dis. Vol. 6, 1987 Michael A. Vanesian et al: "Enzyme Immunoassay for the quantitation of Immunoglobulin M Class antibodies to Salmonella minnesota R595 and Escherichia coli J5 Lipopolysaccharides" pages 11-25 see pages 11-14 -----	1,3-14
A	EP, A, 0271379 (ROUSSEL-UCLAF) 15 June 1988 see abstract; page 6, lines 30-45 -----	
P,X	Journal of Immunological Methods, Vol. 129, 1990, Jeff W. Tyler et al: "Cross- reactive affinity purification of immunoglobulin recognizing common gram- negative bacterial core antigens" pages 221-226 see the whole document -----	1,6-10
¹⁰ Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Δ" document member of the same patent family		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
16 July 1991 (16.07.91)	9 September 1991 (16.09.91)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
European Patent Office		

FR 9100266
SA 46500

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0271379	15-06-88	FR-A- 2606421	13-05-88
		JP-A- 1137993	30-05-89

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 91/00266

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB ⁵ : A 61 K 39/40		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB ⁵	A 61 K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie *	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
X	Diagn Microbiol Infect Dis. Volume 6, 1987 Michael A. Vanesian et al.: "Enzyme Immunoassay for the quantitation of Immunoglobulin M Class antibodies to Salmonella minnesota R595 and Escherichia coli J5 Lipopolysaccharides" pages 11-25 voir pages 11-14	1,3-14
A	----- EP, A, 0271379 (ROUSSEL-UCLAF) 15 juin 1988 voir abstract; page 6 lignes 30-45	
P,X	----- Journal of Immunological Methods, volume 129, 1990 Jeff W. Tyler et al.: "Cross-reactive affinity purification of immunoglobulin recognizing common gram-negative bacterial core antigens." pages 221-226 voir le document en entier	1,6-10
* Catégories spéciales de documents cités: ¹¹ « A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent « E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date « L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) « O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens « P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée « T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à 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 « Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier. « & » document qui fait partie de la même famille de brevets		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 16 juillet 1991	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 09.09.91	
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé miss T. MORTENSEN	

FR 9100266
SA 46500

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 27/08/91

EPO FORM P0472

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82