

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 895 263**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **05 13311**

⑤1 Int Cl⁸ : A 61 K 39/395 (2006.01), A 61 P 43/00, C 07 K 16/00,
1/36

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 26.12.05.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 29.06.07 Bulletin 07/26.

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

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

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

⑦2 Inventeur(s) : CHTOUROU ABDESSATAR SAMI,
DHAINAUT FREDERIC et PAOLANTONACCI PHI-
LIPPE.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : CABINET LEPEUDRY.

⑤4 CONCENTRE D'IMMUNOGLOBINES G (LG) APPAUVRI EN ANTICORPS ANTI-A ET ANTI-B, ET EN IGG
POLYREACTIVES.

⑤7 La présente invention concerne un concentré d'immu-
noglobulines G à usage thérapeutique dans lequel les te-
neurs respectives en anticorps anti-A et anti-B sont
conformes à un résultat négatif au test de Coombs indirect
in vitro. Ce concentré d'IgG présente en outre une teneur
d'IgG polyréactives comprise entre 0,01% et 0,1%, en par-
ticulier entre 0,07 et 0,1%, par rapport à la teneur totale en
IgG.

FR 2 895 263 - A1



La présente invention se rapporte à un concentré d'immunoglobulines G (IgG) appauvri en anticorps anti-A (AcaA) et anti-B (AcaB) et de polyréactivité fortement réduite, ainsi qu'à un procédé d'obtention de tels
5 concentrés.

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

Il y a, à cet effet, un besoin grandissant de produire des concentrés d'Ig hautement purifiés, injectables par voie intraveineuse (IgIV), à partir par
15 exemple de plasmas humains. La complexité de la structure des immunoglobulines (quatre chaînes polypeptidiques réunies par des ponts disulfure), la variété des anticorps présents dans le mélange du plasma de plusieurs milliers de donneurs ne sont pas actuellement des facteurs favorisant
20 le développement biotechnologique des immunoglobulines. Bien que des anticorps monoclonaux soient produits par ingénierie génétique, leur extrême spécificité constitue un inconvénient pour les applications thérapeutiques où une polyspécificité semble nécessaire.

25 En outre, de nombreuses pathologies par exemple d'origine autoimmune sont actuellement traitées par des concentrés d'IgG ce qui a engendré une situation de pénurie en Europe et aux Etats Unis d'Amérique au cours de ces dernières années.

30 Des procédés d'obtention d'immunoglobulines et notamment de concentrés d'IgG peuvent comprendre, outre la précipitation sélective des protéines par l'éthanol, divers traitements additionnels comme la précipitation par le polyéthylène glycol, le traitement ménagé par des enzymes
35 protéolytiques..., destinés à éliminer les agrégats de polymères d'immunoglobulines susceptibles d'activer le

5 système du complément avec des risques associés de réactions anaphylactiques. Par ailleurs, la présence de dimères dans les IgGIV a été corrélée à des chutes de tension artérielle *in vivo* (Bleeker W.K. et al, Blood, 95, 2000, p. 1856-1861).

10 Une voie alternative à la précipitation par l'éthanol a été décrite par Steinbuch et al. (Rev. Franç. Et. Clin. et Biol. 1969, XIV, 1054) qui fait appel à une précipitation par l'acide octanoïque. Celui-ci précipite la plupart des protéines du plasma et laisse dans le surnageant les immunoglobulines. La purification de ces immunoglobulines est réalisée par passage sur un échangeur d'anions, la DEAE-cellulose, dans des conditions qui ne retiennent pas les IgG. La fraction d'IgG non retenue est
15 ensuite concentrée.

Divers procédés ont également été mis au point pour augmenter la pureté des produits par la mise en oeuvre de techniques chromatographiques. On peut notamment citer les demandes de brevets EP 0 703 922 et WO 99/64462, qui
20 décrivent l'association d'au moins deux étapes successives de chromatographie, l'une par échange d'anions, l'autre par échange de cations. La spécificité de ces procédés est apportée par la propriété des échangeurs d'anions de ne pas retenir les immunoglobulines G, dans les conditions
25 classiques de mise en oeuvre, mais de fixer la plupart des autres protéines co-purifiées au cours des étapes de prépurification. De même, on peut citer la demande de brevet WO 02/092632 déposée par la Demanderesse qui divulgue la préparation de concentrés d'Ig mettant en œuvre
30 une unique étape de chromatographie sur échangeur d'anions, effectuée à un pH alcalin pour leur rétention sur le support chromatographique.

Cependant, de nombreuses publications scientifiques indiquent que l'injection d'IgG obtenues par les techniques
35 de fractionnement ci-dessus peuvent provoquer des hémolyses accidentelles, dont certaines sévères, chez des patients en

traitement. On peut à titre d'exemple citer les publications de Buchta C. et al, *Biologicals*, 33, 2005, 41-48, Wilson J.R. et al, *Muscle & Nerve*, 29(9), 1997, 1142-1145, Copelan E.A et al, *Transfusion*, 26, 1986, 410-412 et
5 Misbah S.A et al, *Drug Safety*, 9, 1993, 254-262. L'étude des effets sur le sang des patients présentant une hémolyse, mise en œuvre notamment par le test de Coombs direct (DCT), a montré que les hématies sont couvertes
10 d'immunoglobulines dirigés contre les antigènes A, B ou D présents à leur surface provoquant ainsi leur hémolyse. C'est ainsi que les IgG disponibles dans le commerce sont obtenues à partir de plasmas sélectionnés pour éviter la présence d'immunoglobulines anti-D ou d'autres anticorps à forts titres en anti-A ou anti-B.

15 Buchta C. et al, cité plus haut, a envisagé différentes approches pour réduire de façon significative les anticorps anti-A, provenant de donneurs de groupes sanguins B et O, et anti-B, provenant de donneurs de groupes sanguins A et O, dans les dérivés de plasma, tels
20 que les IgG, pour ainsi minimiser les risques d'hémolyse, directement corrélés aux taux de ces anticorps, lors du traitement des patients par ces dérivés du plasma. Il est notamment envisagé de choisir les donneurs, d'éliminer les anticorps anti-A et anti-B, de fabriquer des dérivés du
25 plasma sanguin issu de groupe spécifique, de groupes A et/ou B, ou de ne pas inclure dans les lots de plasma des titres élevés en anticorps anti-A ou anti-B. Certaines approches sont considérées non réalistes en raisons de coûts ou de la complexité des mesures à prendre. On note
30 que les anticorps anti-A et anti-B sont partiellement éliminés au cours du fractionnement éthanolique mentionné ci-dessus.

Etant donné que les besoins en IgG sont en constante augmentation, il est nécessaire de disposer de pools de
35 plus en plus importants de donneurs qui seront statistiquement d'autant plus riches en groupe sanguin O.

En conséquence, les dérivés sanguins, tels que les IgG, contiennent des quantités d'anticorps anti-A et anti-B trop élevées pour être éliminées par le fractionnement classique.

5 Ces besoins croissants ne rendent pas non plus envisageable de sélectionner par exemple uniquement les donneurs de groupes AB pour s'assurer d'une faible teneur en anticorps anti-A et anti-B.

10 Chaque lot de concentrés ou de préparations d'IgG purifiées est contrôlé vis-à-vis des anticorps anti-A et anti-B selon le test de la Pharmacopée Européenne 2.6.20 (1997), lequel est une application du test de Coombs indirect (ICT) in vitro. L'essai ICT consiste à ajouter à une suspension d'hématies, revêtues des anticorps anti-A ou
15 anti-B de type IgG contenus dans les concentrés d'IgG, une solution d'anticorps (antiglobulines) dirigés contre des motifs de l'IgG humaine. Ces anticorps se fixent sur des anticorps anti-A ou anti-B attachés aux hématies et permettent ainsi leur agglutination par formation de ponts
20 entre les IgG. L'essai de recherche d'anticorps anti-A ou anti-B s'inspire directement de ce test classique en sérologie hématologique (test de Coombs).

Selon la Pharmacopée Européenne, les IgIV ne doivent pas présenter d'agglutination des globules rouges A ou B à
25 l'essai ICT à la dilution 1:64 mis en œuvre avec une solution d'IgG de concentration initiale ramenée à 30 g/l.

C'est la raison pour laquelle il convient de diluer les échantillons d'IgG à tester pour obtenir un titre, c'est-à-dire la valeur de la dernière dilution ne
30 provoquant plus d'agglutination. Des résultats négatifs au test ICT sur les solutions d'IgIV dont les dilutions sont inférieures à la dilution 1:64, selon la Pharmacopée Européenne démontrent un faible taux en anticorps anti-A et anti-B acceptés par celle-ci. Toutefois, même avec des
35 concentrés d'IgG donnant un résultat négatif au test prescrit par la Pharmacopée Européenne, c'est-à-dire ceux

dont le taux de dilution est inférieur à 1:64, les risques de réactions hémolytiques ne peuvent être exclus (Buchta et al déjà cité).

Il convient de noter que les Pharmacopées américaine et japonaise ne contiennent aucune disposition sur la nécessiter de contrôler les teneurs résiduelles en anticorps anti-A et anti-B.

Comme mentionné plus haut, les anticorps anti-A et anti-B sont partiellement éliminés au cours de la préparation de concentrés d'IgG par fractionnement éthanolique mais on en observe une teneur résiduelle qui peut être à la limite des normes hautes de la Pharmacopée Européenne. De plus, les concentrés préparés selon le procédé mis au point par Demanderesse et décrit dans sa demande de brevet WO 02/092632 en contiennent davantage que ceux obtenus par le fractionnement à l'éthanol. Une purification supplémentaire des concentrés d'IgG ainsi obtenus vis-à-vis des AcaA et AcaB est par conséquent nécessaire, étant donné que certains lots de concentrés d'IgG peuvent présenter des teneurs supérieures au seuil admis par la Pharmacopée Européenne pour chacun d'entre eux.

Une des techniques pour les éliminer des concentrés d'IgG consiste à mettre en œuvre une purification par chromatographie d'affinité utilisant comme support des immunoabsorbants de type oligosaccharides similaires aux antigènes A et B des groupes sanguins, de tels oligosaccharides représentant en particulier des trisaccharides, greffés sur une matrice chromatographique.

A titre d'exemple, on peut citer la publication de Mazid M.A et al, J.Appl.Biomater., 3(1), 1992, 9-15, qui utilise un support chromatographique à base de particules de silice sur lesquelles sont greffées des haptènes d'oligosaccharides de synthèse caractéristiques des groupes sanguins A et B, en particulier les A-trisaccharides. Egalement, Hout M.S et al (ASAIO J, 46(6), 2000, 702-706)

décrit la mise en oeuvre de membranes fibreuses tubulaires greffées d'antigènes spécifiques anti-A et anti-B pour l'élimination des anticorps anti-A et anti-B du sang total. Il est également rapporté que de tels supports chromatographiques sont très stables, ce qui limite le relargage de ces haptènes résiduels dans les concentrés d'intérêt.

La demande de brevet WO 01/27623 décrit un procédé d'obtention d'un plasma déspecifié en anticorps de groupes sanguins A et B, c'est-à-dire un plasma convenant à tout receveur. Ces spécificités sont essentiellement portées par des immunoglobulines M (IgM). La déspecification est obtenue par passage sur un support d'affinité expérimental pour le groupe A puis sur un autre support d'affinité, également expérimental, pour le groupe B. En cas de présence simultanée d'anti-A et d'anti-B (groupe O), le passage successif sur les deux supports est nécessaire.

Une des caractéristiques supplémentaires des concentrés d'IgG disponibles dans le commerce est leur polyréactivité. Il convient de rappeler que les anticorps polyclonaux tels que les IgG sont normalement combinés à un seul épitope (motif antigénique) de façon unique. Cependant, cette spécificité stricte des anticorps peut quelques fois s'élargir à d'autres motifs antigéniques et présenter une affinité pour des épitopes secondaires avec une liaison toutefois plus faible que pour le motif nominal. Les IgG polyclonales peuvent réagir plus ou moins fort avec des structures telles que l'actine, la myosine, l'albumine modifiée par le trinitrophényle.

Certains auteurs considèrent que la polyréactivité est une propriété intrinsèque des IgG qui sont donc naturellement présentes dans l'organisme humain.

D'autres démontrent qu'un procédé de purification des IgG monoclonales ou polyclonales peut faire apparaître une polyréactivité indécélable avant purification. En effet, les procédés de fabrication des IgG à partir du plasma

engendrent également une polyréactivité se traduisant par un « stress » oxydatif et la carbonylation partielle des IgG au cours de leur mise en œuvre.

Ceci est confirmé par Bouvet J.-P. et al, Journal of Autoimmunity, 16, 2001, pp.163-172, pour qui les IgG polyclonales deviennent fortement polyréactives après traitement à l'urée notamment. Il est également indiqué dans ce document qu'une partie de l'efficacité des IgG en utilisation clinique est attribuée à leur polyréactivité.

10 Il ressort que la polyréactivité de ces concentrés d'IgG peut donc s'expliquer par la présence conjointes d'IgG polyréactives naturelles et de celles polyréactives obtenues par les procédés de purification habituels, et représentent, selon les cas, 0,5 à 1% de l'ensemble des IgG
15 polyvalentes. Le traitement de patients par les préparations d'IgG peut nécessiter d'en administrer de fortes doses, jusqu'à 1 à 2 g/kg. Ces posologies conduisent à traiter en un temps court, par exemple en une journée, par des quantités de 7 à 10 fois supérieures à celles des
20 IgG physiologiques du receveur. Par conséquent, ce taux d'IgG polyréactives dans les concentrés d'IgG est susceptible d'engendrer des effets secondaires indésirables, telles que des fièvres, nausées ou céphalées.

Toutefois, ces IgG polyréactives ne présentent pas que
25 des inconvénients. En effet, la Demanderesse a montré dans sa demande de brevet EP 1 059 088 que des fractions d'IgG polyréactives, isolées à partir d'IgGIV polyvalentes humaines, peuvent être avantageusement utilisables pour le traitement de certaines maladies inflammatoires, telle que
30 la polyarthrite rhumatoïde, en raison d'une moindre posologie requise pour cette fraction.

Par conséquent, pour éviter des réactions indésirables tant sur le plan de l'hémolyse des hématies que sur le plan des réactions secondaires susceptibles d'être observées par
35 l'administration massive des IgG au cours d'un traitement, il apparaît nécessaire de disposer de concentrés d'IgG à

usage thérapeutique, en particulier pour injection intraveineuse, appauvris de manière significative en anticorps anti-A et anti-B et qui soient, de préférence, de polyréactivité très réduite par rapport aux concentrés
5 d'IgG actuellement disponibles dans le commerce, tout en ayant une efficacité au moins identique sur le plan de l'immunothérapie.

Par conséquent, l'invention concerne un concentré
10 d'immunoglobulines G à usage thérapeutique, caractérisé en ce qu'il présente des teneurs respectives en anticorps anti-A et anti-B conformes à un résultat négatif au test de Coombs indirect in vitro.

Dans le cadre de l'invention, les IgG de ces concentrés
15 représentent avantageusement les IgG polyclonales obtenues à partir du plasma sanguin ou d'une fraction de plasma sanguin déjà enrichie en IgG. Les concentrés d'IgG à usage thérapeutique sont à des concentrations en IgG communément mises en œuvre actuellement, comprises de préférence entre
20 50 et 100 g/l. Ces concentrés sont destinés à un usage clinique et peuvent en particulier être injectés par voie intraveineuse. A cet effet, ils doivent être viralement sécurisés et, le cas échéant, contenir des excipients, tels que des stabilisants, compatibles avec cet usage clinique.

25 La Demanderesse a trouvé qu'il était possible de mettre à disposition de tels concentrés d'IgG présentant des teneurs en anticorps anti-A et anti-B nettement inférieures à celles observées dans les concentrés d'IgG standards, c'est-à-dire à ceux obtenus par fractionnement éthanolique
30 et/ou par la mise en œuvre des techniques de purification associant des chromatographies, comme mentionné plus haut, et qui n'ont pas fait l'objet d'un traitement complémentaire d'élimination des anticorps considérés. Egalement, leurs teneurs sont nettement inférieures aux
35 seuils acceptés par la Pharmacopée Européenne, ce qui limite très significativement les risques d'hémolyse chez

certaines receveurs en traitement. Lorsque l'on soumet les concentrés d'IgG de l'invention à des essais destinés à évaluer les quantités des AcaA et AcaB, on observe que les résultats des essais d'agglutination in vitro des globules rouges A, B et/ou AB en présence d'anticorps anti-IgG humaines sont systématiquement négatifs, notamment à la concentration initiale de 30 g/l imposée par la méthode de la Pharmacopée Européenne.

Lorsque le taux d'anticorps anti-A et anti-B est très faible dans les concentrés d'IgG, le test ICT ne peut plus s'appliquer, a fortiori dans les conditions de la Pharmacopée Européenne, étant donné que les réactions d'agglutination des hématies n'ont plus lieu, même avec l'ajout d'anticorps anti-IgG humaines, car la densité d'anticorps anti-A et anti-B est trop faible pour l'établissement de pontages entre les hématies par des liaisons anticorps anti-A et anti-B fixés sur les hématies et les anticorps anti-IgG humaines.

Il est cependant possible de vérifier la présence des ces anticorps anti-A et/ou anti-B à très faible concentration en provoquant l'immunohémolyse des globules rouges ayant fixé ces anticorps et de mesurer un appauvrissement par rapport à un concentré classique n'ayant pas subi un traitement d'élimination des AcaA et/ou AcaB. L'immunohémolyse est une réaction immunologique spécifique qui se produit lorsque l'anticorps est attaché à sa cible en présence de facteurs du complément. L'activation du système du complément aboutit à la libération de perforines qui transpercent la membrane du globule rouge, laissant sortir l'hémoglobine. Il suffit alors de mesurer par une méthode sensible, par exemple au moyen de traceurs radioactifs (voir plus loin), la quantité d'hémoglobine libérée, proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-A et/ou anti-B présente.

Avantageusement, la Demanderesse a trouvé qu'il était également possible de mettre à disposition de tels

concentrés d'IgG à très faible teneur en IgG polyréactives leur conférant ainsi un caractère quasiment non polyréactif, tout en étant aussi efficace dans le traitement des immunothérapies que les concentrés d'IgG de l'art antérieur. Cette absence notable du caractère de polyréactivité des IgG réduit sensiblement les risques d'effets secondaires susceptibles d'être engendrés à la suite de traitements nécessitant de fortes posologies.

Il est également avantageusement possible de corriger les effets indésirables liés à la présence d'IgG polyréactives dans le concentré d'IgG engendrée notamment par le « stress » oxydatif et la carbonylation durant les procédés de purification.

De préférence, la teneur d'IgG polyréactives est comprise entre 0,01% et 0,1%, en particulier entre 0,07 et 0,1%. Dans le cadre de l'invention, la teneur d'IgG polyréactives signifie un pourcentage molaire ou massique. Cette teneur est déterminée par les méthodes décrites par la Demanderesse dans la demande de brevet 1 059 088.

Les concentrés d'IgG peuvent se présenter sous forme liquide ou lyophilisée en présence de stabilisants appropriés, et être stockés dans l'attente d'une utilisation ultérieure. Ces stabilisants représentent avantageusement ceux mis au point par la Demanderesse dans sa demande de brevet WO 2004/091656 A2, à savoir un mélange d'un sucre alcoolique, de préférence le mannitol, le sorbitol ou leurs isomères, de glycine et d'un détergent non ionique, tel que le Tween[®]80, le Tween[®]20, le Triton[®] X 100 ou le Pluronic[®]F68, tous trois composés acceptables sur le plan pharmaceutique.

Les concentrations de la formulation ont été déterminées par la Demanderesse pour stabiliser les formes liquides et/ou lyophilisées.

De préférence, les concentrations finales dans les concentrés en mannitol sont comprises entre 30 g/l et 50 g/l, celles du détergent, entre 20 et 50 ppm, et celles de

la glycine, entre 7 g/l et 10 g/l. Les concentrations de ces composés représentent les concentrations finales dans les concentrés d'IgG.

De tels concentrés d'IgG, à usage thérapeutique, peuvent en particulier être injectés par voie intraveineuse, comme indiqué précédemment. A cet effet, les concentrés d'IgG selon l'invention doivent être viralement sécurisés par exemple par un traitement classique au solvant-détergent connu dans l'art antérieur, utilisant par exemple un mélange Tween[®]80/TnBP ou Triton[®] X 100 /TnBP, et/ou subir des étapes de filtration pour éventuellement éliminer les virus et/ou autres macromolécules qui n'auraient pas été éliminés par le traitement virucide de solvant-détergent, tels que le prion, agent responsable des encéphalopathies spongiformes transmissibles.

L'invention concerne également un procédé d'obtention d'un concentré d'IgG tel que mentionné ci-dessus, comprenant les étapes suivantes de :

- a) préparation d'un concentré d'IgG par fractionnement éthanolique et/ou par séparation chromatographique, associant une étape d'inactivation virale,
- b) chromatographie d'immunoaffinité par percolation dudit concentré d'IgG sur un mélange de supports dont les matrices sont greffées de groupes oligosaccharides antigéniquement similaires aux groupes sanguins A et B, et
- c) filtration d'élimination de virus et/ou de particules de taille supérieure à 20 nm.

La Demanderesse a trouvé de manière surprenante que non seulement un tel procédé pouvait très avantageusement être mis en œuvre à l'échelle industrielle, mais que la combinaison d'étapes aboutissant à la préparation de concentrés d'IgG et d'une étape spécifique d'élimination d'anticorps anti-A et anti-B permettait d'obtenir un concentré d'IgG selon l'invention, à usage thérapeutique,

comprenant en outre, de préférence, un taux d'IgG polyréactives inférieur à 0,1% par rapport à la teneur totale en IgG. De surcroît, un tel concentré comprend un taux en AcaA et AcaB indésirables bien inférieur à la
5 valeur limite basse de l'essai décrit dans la Pharmacopée Européenne.

De préférence, l'étape a) du procédé peut être en elle-même un procédé d'obtention de concentrés d'IgG, tels que ceux mentionnés précédemment. Il s'agit d'un fractionnement
10 éthanolique développé par Cohn et al ou bien d'une séparation chromatographique, telle que décrite par exemple dans EP 0 703 922 et WO 99/64462. On préfère tout particulièrement les procédés mis au point par la Demanderesse dans les demandes de brevet WO 94/29334 et WO
15 02/092632 A1, et tout particulièrement celui décrit dans WO 02/092632 A1. Dans ce cas, l'étape a) du procédé de l'invention comprend une prépurification par précipitation de contaminants lipidiques à partir d'un plasma sanguin ou d'une fraction de plasma sanguin enrichie en IgG, une
20 chromatographie unique sur un support de résine échangeuse d'anions effectuée à pH alcalin, une élution sélective des IgG en une étape par un tampon approprié à pH compris entre 4 et 7.

L'étape a) du procédé comprend un traitement
25 d'inactivation de virale, de préférence effectué par solvant-détergent, comme décrit par Horowitz dans le brevet US 4 764 369. Il sera en particulier judicieusement mis en œuvre, le cas échéant, avant une ou l'étape chromatographique subséquente permettant d'éliminer
30 notamment les résidus chimiques de ce traitement.

La fraction d'IgG ainsi récoltée est déjà suffisamment concentrée, et peut ensuite subir des étapes de concentration supplémentaire par ultrafiltration et de filtration stérilisante.

35 Ce concentré est ensuite soumis à une étape chromatographique d'immunoaffinité sur un mélange de deux

supports greffés de groupes antigéniquement similaires aux groupes sanguins A et B, de préférence sur une colonne remplie d'un tel mélange de supports.

De préférence, le support chromatographique est
5 constitué d'une matrice en polymère naturel réticulé, de type agarose, sur laquelle sont greffés des espaceurs ou des bras de couplage, étant à leur tour greffés avec des trisaccharides correspondants aux épitopes des groupes sanguins A et B. Un tel support représente de préférence un
10 gel ou résine disponible dans le commerce sous la dénomination GLYCOSORB ABO[®], provenant de chez Glycorex Transplantation AS (Suède).

Avantageusement, le mélange de supports greffés de groupes antigéniquement similaires au groupe sanguin A et
15 groupe sanguin B est en une proportion respective comprise entre 25/75 et 75/25 (v/v). Il est en effet possible d'ajuster la proportion des deux supports dans la colonne à la population des donneurs selon la répartition des groupes sanguins de celle-ci. Dans le cadre d'une utilisation
20 habituelle, la colonne sera remplie de préférence avec un mélange de 50/50 (v/v) en chaque support spécifique ci-dessus. On peut utiliser des colonnes analytiques de 15 à 25 cm de longueur et de 0,5 à 1 cm de diamètre. Dans le cas d'une mise en œuvre à l'échelle pilote, on peut utiliser
25 des colonnes de 40 à 60 cm de longueur et de 40 à 60 mm de diamètre. Dans ce cas, il est possible de charger la colonne de 600 ml de support d'immunoaffinité.

Un tel support est stocké en NaOH 1 M entre deux cycles d'utilisation. Avant utilisation, il est lavé par de l'eau.

30 On charge ensuite la colonne chromatographique d'immunoaffinité en concentré d'IgG de préférence à raison de 0,2 à 4 litres, en particulier de 1 à 2 litres, par millilitre de support. La spécificité d'un tel support ne nécessite pas un conditionnement préalable de la fraction
35 d'IgG, c'est-à-dire que toute fraction ou concentré d'IgG obtenue par les techniques de fractionnement de plasma de

l'art antérieur peut convenir.

La percolation du concentré ne fait pas intervenir le mécanisme d'élution. Par conséquent, quelque soit la manière dont est obtenu le concentré d'IgG, il est percolé à travers la colonne, éventuellement grâce à une pompe. Cette percolation permet la rétention des AcaA et AcaB et des IgG polyréactives. Avantageusement, la colonne est ensuite lavée par de l'eau pour récupérer les IgG encore présentes dans le volume mort de la colonne.

Après percolation du concentré d'IgG, on obtient une fraction d'IgG appauvrie en AcaA et AcaB, ainsi qu'en IgG polyréactives. En effet, les AcaA et AcaB sont retenus sur leur motif antigénique du support chromatographique qui en modifie la conformation. Par conséquent, les IgG polyréactives sont également retenues sur les sites dévoilés par ce changement conformationnel. L'affinité des ces IgG polyréactives retenues de façon secondaire est beaucoup moins importante que celle des AcaA et AcaB. Il est possible de les éluer de manière fractionnée, après le passage des IgG, par l'utilisation d'un tampon d'élution contenant, par exemple, un sel de métal alcalino-terreux de concentration comprise entre 0,1 et 1,5 M, à un pH de 3-8,6.

Le procédé peut comprendre, après l'étape b), des étapes de concentration par ultrafiltration et de filtration stérilisante.

La colonne chromatographique et le support sont ensuite lavés avec une solution acide, telle que de glycine-HCl, pH 2,8, pour la désorption des AcaA et AcaB retenus sur le support. Ce support est ensuite rincé avec de l'eau et traité avec une solution de NaOH 1 M.

Le concentré d'IgG très appauvri en AcaA, AcaB et IgG polyréactives est ensuite soumis à une filtration d'élimination de virus résistants au traitement par solvant-détergent et/ou autres particules de taille supérieure à 20 nm, tels que les prions, les polymères d'IgG engendrés lors d'étapes de sa fabrication, les lipopolysaccharides en micelles, les acides nucléiques et

les protéines agrégées. Un tel traitement représente
avantageusement la nanofiltration, mise en œuvre par des
filtres de porosité décroissante de 100 à 15 nm, en
particulier sur trois filtres disposés en série et de
5 seuils de rétention décroissants, de 100, 50 et 20 nm.

Le procédé peut comprendre, après l'étape c), une étape
supplémentaire d'ajout de stabilisants afin, d'une part,
d'assurer la stabilité des concentrés d'IgG en cours de
conservation dans le temps et, d'autre part, permettre une
10 lyophilisation évitant la dénaturation des IgG dans les
diverses phases associées à celle-ci. De préférence, il
sera ajouté une formulation stabilisante unique,
pharmaceutiquement acceptable, répondant à l'objectif
d'assurer la stabilisation des deux formes de conservation
15 envisagées des IgG à la fois, à savoir sous forme liquide
ou lyophilisée, et de conserver, voire améliorer,
l'efficacité thérapeutique de ces IgG, comme décrit dans la
demande de brevet WO 2004/091656 A2.

Selon d'autres modes de réalisation, il est également possible
20 de récupérer sélectivement d'autres immunoglobulines, comme décrit
dans la demande de brevet WO 02/092632 A1.

Les concentrés d'IgG sont éventuellement soumis à une
étape ultérieure de concentration par ultrafiltration, puis
à une filtration stérilisante et peuvent être conditionnés
25 dans des flacons et conservés de préférence à des
températures voisines de 4°C.

Comme largement explicité précédemment, les concentrés
d'IgG selon l'invention comprennent des teneurs en AcaA et
AcaB bien inférieures aux seuils admis par la Pharmacopée
30 Européenne. Par conséquent, la méthode de dosage 2.6.20
(1997) qui y est indiquée, peut s'avérer insuffisamment
sensible pour détecter les anticorps considérés présents en
de très faibles teneurs dans les concentrés d'IgG de
l'invention. Il est donc essentiel de mettre au point des
35 méthodes de dosages de ces anticorps ayant un seuil de
détection plus bas que celui du test ICP de la Pharmacopée

Européenne appliqué à la détection des AcaA et AcaB.

De préférence, une méthode de dosage des AcaA et AcaB des concentrés d'IgG ci-dessus est effectuée par cytométrie de flux adaptée au contexte de l'invention, dont le principe repose sur l'utilisation d'hématies humaines de
5 groupe A ou B, selon la détermination spécifique du titre des AcaA et AcaB voulue, mettant en œuvre la détection d'un signal de fluorescence proportionnel à la teneur en ces anticorps.

10 Une telle méthode de dosage comprend les étapes consistant à :

- a) préparer et calibrer une suspension d'hématies du groupe sanguin A ou B,
- b) mettre en contact lesdites hématies avec des
15 échantillons dilués de solutions d'IgG, et incuber le mélange ainsi obtenu pendant une durée prédéterminée,
- c) incuber lesdites hématies en présence d'un anticorps anti-IgG marqué au moyen d'un fluorochrome,
- d) soumettre la suspension d'hématies obtenue à l'étape
20 c) à une cytométrie de flux.

On prépare une suspension d'hématies à 1% (v/v) du groupe sanguin A ou B dans un tampon PBS, de pH compris entre 7,0 et 7,4, contenant de 0,8 à 1,5 % en poids de
25 sérum-albumine bovine BSA. Les hématies de la suspension sont comptées dans un dispositif de cytométrie de flux habituel, dont la mise en œuvre est connue de l'homme du métier, puis de façon à calibrer la suspension à 37 à $43 \cdot 10^6$ hématies/ml de suspension.

30 On place un volume de 50 à 100 μ l de la suspension dans chaque puit d'une microplaque de 96 puits, puis de 50 à 100 μ l de différentes solutions d'IgG diluées de deux en deux à partir d'une solution de 30 g/l jusqu'à obtenir une solution d'IgG à 0,234 g/l.

35 L'ensemble est mis à incuber pendant des durées comprises entre 1h30 et 2h30, en particulier 2h, à des

températures habituellement comprises entre 30 et 40°C, de préférence 37°C.

Les hématies sont ensuite lavées avec le tampon PBS contenant de la BSA précédente et est centrifugées puis on
5 ajoute dans chaque puit de 50 à 100 μ l d'anticorps F(ab')₂ de chèvre anti-IgG humaines marquées d'un fluorochrome, tel que par exemple la phycoérythrine.

L'incubation de l'ensemble (l'étape c)) est mise en oeuvre pendant environ 20-30 min à l'abri de la lumière.

10 La suspension ainsi obtenue est ensuite lavée et soumise à une cytométrie de flux mise en œuvre avec tout appareil approprié disponible dans le commerce comportant un dispositif de détection de fluorescence des composés analysés.

15 A titre d'exemple, les teneurs en anticorps anti-A et B de trois concentrés d'IgG dénommés B1, B2 et B3, préparés respectivement par fractionnement éthanolique selon la méthode de Cohn (citée plus haut) (B1), selon la demande de brevet WO 02/092632 (B2) et selon la demande de brevet
20 WO 02/092632 suivie d'une chromatographie d'immunoaffinité (B3) pour l'appauvrissement en anticorps anti-A et anti-B, sont présentées dans le Tableau 1 qui suit. Les résultats sont présentés par rapport au titre témoin en anticorps anti-A et anti-B de l'échantillon B1 dont la teneur en ces
25 anticorps a été fixée arbitrairement à 1, à titre de référence.

Tableau 1

Echantillons	Titre en anticorps anti-A	Titre en anticorps anti-B
B1	1	1
B2	3,65	3,85
B3	0,68	0,52

Les résultats de ce tableau montrent tout d'abord que les teneurs en anticorps anti-A et anti-B des concentrés d'IgG (B1), préparés selon la méthode de Cohn, en contiennent environ quatre fois moins que les concentrés d'IgG (B2), préparés selon la méthode décrite dans WO 02/092632. De plus, le traitement ultérieur des ces concentrés d'IgG par des colonnes d'immunoaffinité spécifiques réduisent le titre en anticorps anti-A d'un facteur voisin de 5 et d'un facteur voisin de 7 en anticorps anti-B (B3).

Une autre méthode de détermination de la teneur en anticorps anti-A et anti-B pouvant être avantageusement mise en œuvre consiste en la lyse par le complément *in vitro*, connue de l'homme du métier, mais qui a été spécifiquement mise au point pour les besoins de l'invention.

Une telle méthode de dosage comprend les étapes consistant à :

- a) procéder à un radiomarquage d'une suspension d'hématies papainées choisies parmi les groupes sanguins A, B, AB et O, préalablement comptées, par un marqueur radioactif approprié,
- b) mettre en contact les hématies radiomarquées avec des échantillons de concentrés d'IgG en un volume prédéterminé,
- c) ajouter un volume identique à celui de l'étape b) de sérum normal du groupe sanguin AB,
- d) incuber le mélange obtenu à l'étape c) pendant une durée prédéterminée, et
- e) mesurer la radioactivité de la solution incubée ainsi obtenue.

On prépare une suspension d'hématies papainées à 1% (v/v) du groupe sanguin A, B, AB ou O qui est ensuite comptée dans une cellule de Malassez pour obtenir 10^6 hématies. On ajoute 100 μ Ci de ^{51}Cr (1 volume pour 1 volume

d'hématies). On incube l'ensemble entre 1 et 2 heures, et les hématies radiomarquées sont ensuite lavées entre 4 et 6 fois.

Les hématies radiomarquées sont ensuite mises en contact avec des échantillons de concentrés d'IgG, à une concentration comprise de préférence entre 1 et 3 mg/ml, en particulier 1,2 mg/ml pour $4-6 \cdot 10^6$ hématies radiomarquées, dans un volume par exemple de 100 μ l.

Un volume identique au précédent, par exemple de 100 μ l, de sérum normal de groupe sanguin AB est ensuite ajouté au mélange précédent pour apporter les différents facteurs de la voie de complément.

Le mélange réactionnel ainsi obtenu est ensuite incubé, de préférence pendant des durées comprises entre 3 et 5h, en particulier 4h, à des températures habituellement comprises entre 30 et 40°C, de préférence 37°C.

Le mélange réactionnel est ensuite, de préférence, centrifugé, et on procède à une mesure de la radioactivité de la solution incubée selon des dispositifs appropriés disponibles dans le commerce. La radioactivité mesurée de la solution est proportionnelle au taux d'hémolyse des hématies traitées et, par conséquent, à la teneur en anticorps anti-A et anti-B.

A titre d'exemple, les taux d'hémolyse des hématies des groupes sanguins A, B et AB obtenus en considérant un concentré d'IgG de l'invention (B3) et un concentré d'IgG de l'art antérieur (C1) ayant des taux d'hémolyse les plus faibles parmi les concentrés disponibles dans le commerce, sont indiqués au Tableau 2 qui suit.

30

35

Tableau 2

Taux d'hémolyse d'hématies (%)	B3	C1 (art antérieur)
Groupe A	6	13
Groupe B	5	11
Groupe AB	6	13

Les exemples qui suivent illustrent des modes de
 5 réalisation de la présente invention sans toutefois en
 limiter la portée.

Exemple 1

Un échantillon de concentré d'IgG à 40 g/l (B2) est
 10 obtenu par la mise en œuvre du procédé décrit dans WO
 02/092632.

Une colonne chromatographique de 50 cm de longueur et
 de 44 mm de diamètre est remplie d'un mélange 50/50 (v/v)
 de support GLYCOSORB ABO[®] greffé par des trisaccharides
 15 correspondants aux épitopes du groupe sanguin A et du
 groupe sanguin B, puis est soumise à une étape préalable de
 lavage par 1200 ml d'eau.

On injecte du concentré d'IgG B2 à raison de 0,2 l/ml
 de support par l'intermédiaire d'une pompe. Une fois que ce
 20 volume a été percolé à travers la colonne, celle-ci est
 lavée par un volume minimal d'eau pour préparation
 injectable (PPI) afin de récupérer les IgG présentes dans
 le volume mort de la colonne.

On récupère un concentré d'IgG B3 à environ 40 g/l
 25 appauvri en AcaA, AcaB et en IgG polyréactives qui est
 soumis à une ultrafiltration de façon que le concentré soit
 à 60 g/l et à une nanofiltration d'élimination de virus sur
 trois filtres disposés en série et de seuils de rétention
 décroissants de 100, 50 et 20 nm.

30 La dissolution des excipients stabilisants constitués
 d'un mélange de glycine à 7 g/l, de mannitol à 30 g/l et de

20 ppm de Tween[®]80 dans le concentré d'IgG à 60 g/l est suivie d'un ajustement de la concentration en IgG à 50 g/l au moyen d'eau PPI, puis le concentré est filtré stérilement et réparti en flacons.

5

Exemple 2

On prépare une suspension d'hématies à 1% (v/v) du groupe sanguin A dans un tampon PBS, de pH 7,4, contenant 10 1% en poids de sérum-albumine bovine BSA. On prélève 50 μ l de la suspension d'hématies et on les introduit dans un tube pour un cytomètre de flux Beckmann-Coulter Epics XL, ainsi que 50 μ l d'une solution de marqueur interne mesurant le flux. La suspension est calibrée à $40 \cdot 10^6$ hématies/ml.

15

Huit lots de solutions d'IgG sont préparés par dilution successive d'un facteur 2 du concentré d'IgG (v/v) (B3) obtenu à l'exemple 1, le lot le plus concentré étant à 30 g/l, le plus dilué à 0,234 g/l. On place ensuite un volume 20 de 50 μ l de la suspension dans chaque puit d'une microplaque de 96 puits, puis 50 μ l des différentes solutions d'IgG diluées.

L'ensemble est mis à incuber pendant 2h à une température de 37°C, sous agitation.

25 Chaque puit est ensuite lavé avec 200 μ l de tampon PBS contenant de la BSA précédente et la microplaque est centrifugée pendant 1 minute à 2000 tours/min. Après élimination du surnageant, on ajoute dans chaque puit 50 μ l d'une solution diluée à 1/20 par du PBS-BSA d'anticorps 30 F(ab')₂ de chèvre anti-IgG humaines marquées de fluorochrome de phycoérythrine (Beckmann Coulter).

L'incubation de l'ensemble est mise en oeuvre pendant 30 min à l'abri de la lumière.

35 La suspension ainsi obtenue est ensuite lavée comme précédemment.

Le culot de chaque puit est repris par 100 μ l de PBS-

BSA. Le volume contenu dans chaque puit de la microplaque est transféré dans un tube dans lequel sont ensuite ajoutés 500 μ l de liquide de gaine Isoflow (Coulter) et est soumis à une cytométrie de flux mise en œuvre avec le dispositif
 5 Coulter-Beckmann Epics XL comprenant des logiciels d'acquisition des données et d'exploitation des résultats. La fluorométrie est mesurée pour chaque échantillon.

On procède de la même manière avec des hématies de groupe sanguin B.

10 Ce mode opératoire est mis en œuvre avec trois lots différents d'IgG (B3) et est également appliqué à trois lots différents d'IgG préparés par fractionnement éthanolique selon la méthode de Cohn (citée plus haut) (B1).

15 Les résultats obtenus figurent dans le Tableau 3 qui suit.

Tableau 3

Echantillons	Titre en anticorps anti-A	Titre en anticorps anti-B
B1	1	1
B2 (3 lots)	3,80 ; 3,55 ; 3,59	3,80 ; 4,45 ; 3,31
B3 (3 lots)	0,66 ; 0,68 ; 0,69	0,33 ; 0,73 ; 0,50

20

Exemple 3

On prépare une suspension d'hématies papainées à 1% (v/v) du groupe sanguin A, B, AB ou O qui est ensuite comptée dans une cellule de Malassez pour obtenir 10⁶
 25 hématies. On ajoute 100 μ Ci de ⁵¹Cr (1 volume pour 1 volume d'hématies). On incube l'ensemble pendant 1 heure et les hématies radiomarquées sont ensuite lavées 5 fois.

Les hématies radiomarquées sont ensuite mises en

contact avec des échantillons de concentrés d'IgG (B2) obtenus à l'exemple 1, à une concentration de 1,2 mg/ml pour 5.10^6 hématies radiomarquées, dans un volume de 100 μ l.

5 Un volume identique au précédent de 100 μ l de sérum normal de groupe sanguin AB est ensuite ajouté au mélange précédent pour apporter les différents facteurs du complément.

10 Le mélange réactionnel ainsi obtenu est ensuite incubé, 4h, à une température de 37°C.

Le mélange réactionnel est ensuite centrifugé pendant 1 minute à 2000 tours/min, et on procède à une mesure de la radioactivité de la solution surnageante incubée, selon des dispositifs appropriés disponibles dans le commerce. La radioactivité mesurée de la solution est proportionnelle au 15 taux d'hémolyse des hématies traitées et, par conséquent, à la teneur en anticorps anti-A et anti-B.

On procède de façon identique avec des hématies des groupes sanguins B, AB et O, étant tous de rhésus +, et 20 avec un échantillon de sérum du groupe O+. Ce mode opératoire est mis en œuvre avec trois lots différents d'IgG (B2).

En outre, on applique le procédé à trois lots d'échantillons du commerce de concentrés d'IgG, notés C2 à 25 C4, et un échantillon C5 de sérum du groupe O+, inclus comme témoin négatif.

La radioactivité mesurée de la solution est proportionnelle au taux d'hémolyse des hématies traitées et, par conséquent, à la quantité en anticorps anti-A et 30 anti-B fixés sur les hématies.

Les résultats d'hémolyse obtenus sont présentés dans le Tableau 4 suivant.

Tableau 4

Taux d'hémolyse d'hématies (%)	B3	C2	C3	C4	C5
Groupe A+	6 6,2 6,5	16 15,5 16,3	13 13,5 13,2	30 31 31	34 34,4 34,6
Groupe B+	5 4,8 5,4	13,1 13,3 13,4	11,2 10,8 10,9	25 25,3 25,4	34 34,4 34,6
Groupe AB+	6 5,9 6,5	16 15,7 16,3	15,1 15,1 15,4	31 31,4 30,9	34 34,4 34,6
Groupe O+	0,1 0,15 0,12	0,2 0,25 0,21	0,22 0,24 0,24	0,33 0,32 0,30	2 2,2 2,7

Les résultats obtenus montrent que le concentré d'IgG B3 qui a été soumis à une chromatographie d'affinité selon l'invention contient la plus faible quantité en AcaA et AcaB étant donné que le taux d'hémolyse des hématies provenant des différents groupes sanguins est le plus faible.

On n'observe pas d'hémolyse avec des hématies de phénotype O+, inclus comme témoin négatif.

Exemple 4

Mesure de la polyréactivité des concentrés d'IgG B2 (avant la chromatographie d'immunoaffinité) et après cette chromatographie (concentré d'IgG B3) décrite à l'exemple 1.

La mesure de la polyréactivité de ces concentrés d'IgG est effectuée selon le brevet EP 1 059 088 en utilisant deux antigènes qui réagissent avec les IgG polyréactives. Il s'agit de la myosine et de l'albumine modifiée par des

groupes dinitrophényle (Albumine DNP).

Le Tableau 5 présente les facteurs d'enrichissement des IgG polyréactives des échantillons B2, B3 et C4 de l'exemple 3 dont la teneur en IgG a été fixée arbitrairement à 1, à titre de référence.

Ces mesures ont été effectuées sur trois lots différents de concentrés d'IgG considérés.

Tableau 5

10

Echantillon	Myosine	Albumine DNP
B1	1	1
B2 (3 lots)	1,2 ; 0,8 ; 1,2	3,2 ; 1,0 ; 2,0
B3 (3 lots)	0,4 ; 0,4 ; 0,4	1,0 ; 1,0 ; 1,0
C4 (3 lots)	2,0 ; 2,0 ; 2,0	8,0 ; 6,0 ; 7,0

Les résultats indiquent que le concentré d'IgG B3 de l'invention contient de 5 à 8 fois moins d'IgG polyréactifs que le concentré de l'art antérieur C4.

15

Exemple 5

Exemple comparatif sur l'efficacité des concentrés IgG (B3) appauvries en AcaA, AcaB, et en IgG polyréactives, avec des concentrés d'IgG (B1).

20

L'étude a porté sur des souris déficientes en récepteurs FcγRI et FcγRIII traitées dans la perspective d'évaluation de l'activité immunomodulatrice des concentrés d'IgG selon l'invention. Ces animaux servent de modèle à un purpura thrombocytopénique.

25

On utilise comme témoin un concentré d'IgG (B1) obtenu par fractionnement éthanolique selon Cohn.

On applique le protocole expérimental décrit par Teeling J.L et al (Blood, 15/08/2001, vol. 98, number 4, pp.1095-1099).

30

Les plaquettes, effondrées par injection d'IgG monoclonales antiplaquettes de 9.10^8 /ml au niveau de

2.10⁸/ml, remontent à 7.10⁸/ml chez les animaux traités par les concentrés d'IgG B1 et B3 à une dose thérapeutique de 1 g/kg.

L'activité immunomodulatrice du concentré d'IgG B3
5 selon l'invention n'a pas été modifiée par la mise en œuvre de la chromatographie d'immunoaffinité.

Revendications

1. Concentré d'immunoglobulines G à usage thérapeutique, caractérisé en ce qu'il présente des teneurs respectives en anticorps anti-A et anti-B conformes à un résultat négatif au test de Coombs indirect in vitro.
2. Concentré d'immunoglobulines G selon la revendication 1, présentant en outre une teneur d'IgG polyréactives comprise entre 0,01% et 0,1%, en particulier entre 0,07 et 0,1%, par rapport à la teneur totale en IgG.
3. Concentré selon la revendication 1 ou 2, comprenant des stabilisants destinés à permettre le stockage dudit concentré.
4. Concentré selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel les stabilisants représentent un mélange d'un sucre alcoolique, de préférence le mannitol ou sorbitol, de glycine et d'un détergent non ionique.
5. Concentré selon l'une des revendications 1 à 4, injectable par voie intraveineuse.
6. Procédé d'obtention d'un concentré d'IgG selon l'une des revendications 1 à 5, comprenant les étapes suivantes de :
 - a) préparation d'un concentré d'IgG par fractionnement éthanolique et/ou par séparation chromatographique, associant une étape d'inactivation virale,
 - b) chromatographie d'immunoaffinité par percolation dudit concentré d'IgG sur un mélange de supports dont les matrices sont greffées de groupes oligosaccharides antigéniquement similaires aux groupes sanguins A et B, et
 - c) filtration d'élimination de virus et/ou de particules de taille supérieure à 20 nm.
7. Procédé selon la revendication 6, dans lequel l'étape a) du procédé de l'invention comprend une prépurification par précipitation de contaminants lipidiques à partir d'un plasma sanguin ou d'une fraction

de plasma sanguin enrichie en IgG, une chromatographie unique sur un support de résine échangeuse d'anions effectuée à pH alcalin et une élution sélective des IgG en une étape par un tampon approprié à pH compris entre 4 et
5 7.

8. Procédé selon l'une des revendications 6 et 7, dans lequel l'étape d'inactivation virale est effectuée par solvant-détergent.

9. Procédé selon l'une des revendications 6 à 8, dans
10 lequel le mélange de supports greffés de groupes antigéniquement similaires au groupe sanguin A et groupe sanguin B est en une proportion respective comprise entre 25/75 et 75/25 (v/v), de préférence 50/50 (v/v) en chacun desdits supports.

15 10. Procédé selon l'une des revendications 6 à 9, comprenant, après l'étape b), des étapes de concentration par ultrafiltration et de filtration stérilisante.

11. Procédé selon l'une des revendications 6 à 10, dans
20 lequel la filtration d'élimination des virus est effectuée par nanofiltration.

12. Procédé selon l'une des revendications 6 à 11, comprenant, après l'étape c), une étape d'ajout de stabilisants de conservation audit concentré d'IgG.



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

N° d'enregistrement
national

FA 677482
FR 0513311

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	BUCHTA CHRISTOPH ET AL: "Potential approaches to prevent uncommon hemolytic side effects of ABO antibodies in plasma derivatives" BIOLOGICALS, vol. 33, no. 1, mars 2005 (2005-03), pages 41-48, XP004745182 ISSN: 1045-1056 * le document en entier *	1-5	A61K39/395 A61P43/00 C07K16/00 C07K1/36
Y	-----	6-12	
Y	MAZID M A ET AL: "An improved affinity support and immunoabsorbent with a synthetic blood group oligosaccharide and polymer coating for hemoperfusion." JOURNAL OF APPLIED BIOMATERIALS : AN OFFICIAL JOURNAL OF THE SOCIETY FOR BIOMATERIALS. SPRING 1992, vol. 3, no. 1, avril 1992 (1992-04), pages 9-15, XP008069266 ISSN: 1045-4861 * abrégé *	6-12	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
A	HOUT M S ET AL: "Specific removal of anti-A and anti-B antibodies by using modified dialysis filters." ASAIO JOURNAL (AMERICAN SOCIETY FOR ARTIFICIAL INTERNAL ORGANS : 1992) 2000 NOV-DEC, vol. 46, no. 6, novembre 2000 (2000-11), pages 702-706, XP000977681 ISSN: 1058-2916 * abrégé *	6-12	C07K
	----- -/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
27 septembre 2006		Le Flao, Katell	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>	

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



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

N° d'enregistrement
national

FA 677482
FR 0513311

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	KNEZEVIC-MARAMICA IRINA ET AL: "Intravenous immune globulins: an update for clinicians." TRANSFUSION. OCT 2003, vol. 43, no. 10, octobre 2003 (2003-10), pages 1460-1480, XP002400780 ISSN: 0041-1132 * page 1471, colonne de droite, alinéa 3 *	1-5	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
X	NICHOLLS M D ET AL: "HEMOLYSIS INDUCED BY INTRAVENOUSLY-ADMINISTERED IMMUNOGLOBULIN" MEDICAL JOURNAL OF AUSTRALIA, vol. 150, no. 7, 1989, pages 404-406, XP008069268 ISSN: 0025-729X * page 405, colonne de droite, ligne 2 *	1-5	
X	MISBAH SIRAJ A ET AL: "Adverse effects of intravenous immunoglobulin" DRUG SAFETY, vol. 9, no. 4, 1993, pages 254-262, XP008069247 ISSN: 0114-5916 * page 258, colonne de gauche, alinéa 1 *	1-5	
A	COPELAN E A ET AL: "Hemolysis following intravenous immune globulin therapy." TRANSFUSION. 1986 SEP-OCT, vol. 26, no. 5, septembre 1986 (1986-09), pages 410-412, XP008069245 ISSN: 0041-1132 * le document en entier *	1-12	
		-/--	
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		27 septembre 2006	Le Flao, Katell
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



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

N° d'enregistrement
national

FA 677482
FR 0513311

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	GORDON J M ET AL: "Levels of anti-A and anti-B in commercial immune globulins." TRANSFUSION. 1980 JAN-FEB, vol. 20, no. 1, janvier 1980 (1980-01), pages 90-92, XP008069246 ISSN: 0041-1132 * le document en entier *	1-12	
D,A	FR 2 824 568 A (LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES) 15 novembre 2002 (2002-11-15) * exemples 1-5 *	6-12	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		27 septembre 2006	Le Flao, Katell
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0513311 FA 677482**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 27-09-2006

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication	
FR 2824568	A	15-11-2002	AT 312120 T	15-12-2005
			AU 2002257887 A2	25-11-2002
			CA 2446704 A1	21-11-2002
			DE 60207848 T2	17-08-2006
			DK 1385886 T3	18-04-2006
			EP 1385886 A1	04-02-2004
			ES 2254676 T3	16-06-2006
			WO 02092632 A1	21-11-2002
			JP 2005500265 T	06-01-2005
			US 2004132979 A1	08-07-2004
