

Perfectionnement aux méthodes de séparation de protéines sériques et notamment de la gamma globuline à partir de placentas humains ou de sang hémolysé.
(Invention : Robert PLAN.)

Société anonyme dite : INSTITUT MÉRIEUX résidant en France (Rhône).

Demandé le 26 mai 1965, à 16^h 24^m, à Paris.

Délivré par arrêté du 5 décembre 1966.

(Bulletin officiel de la Propriété industrielle, n° 2 du 13 janvier 1967.)

(Brevet d'invention dont la délivrance a été ajournée en exécution de l'article 11, § 7, de la loi du 5 juillet 1844 modifiée par la loi du 7 avril 1902.)

Dans sa demande de brevet P.V. n° 16.820 du 12 mai 1965, la demanderesse a décrit un procédé d'élimination de l'hémoglobine en solution dans du sang humain obtenu à partir de placentas humains ou ayant subi une hémolysation.

Ce procédé ne permet pas toutefois de préparer de la gamma globuline absolument incolore à partir de sang hémolysé ou de sang provenant de placentas humains.

Le nouveau procédé objet de la présente invention est caractérisé notamment par le fait qu'au lieu d'éliminer l'hémoglobine avant de recourir aux méthodes de fractionnement connues en vue d'extraire des protéines sériques telle que la gamma globuline, on met en œuvre ces méthodes de fractionnement sans éliminer préalablement l'hémoglobine, et on soumet ensuite les produits extraits par lesdites méthodes de fractionnement à un traitement de purification permettant d'absorber la totalité de l'hémoglobine et de ses dérivés, notamment les pigments colorants qui accompagnent ces produits, sur des résines échangeuses d'ions, de façon à obtenir des protéines sériques, et en particulier de la gamma globuline parfaitement incolore.

Sans revenir sur le détail des méthodes de fractionnement à l'alcool, qui ont été décrites par l'équipe de Cohn et ses successeurs de l'Université de Boston, il y a lieu de remarquer simplement que lorsqu'on emploie du sang provenant d'autres sources que la ponction veineuse, c'est-à-dire soit du sang hémolysé soit du sang provenant de placentas humains, l'hémoglobine est entraînée dans la plupart des fractions que l'on peut isoler par l'une quelconque des méthodes connues à ce jour.

Or il est avantageux de pouvoir utiliser notamment du sang provenant de placentas humains,

pour réaliser une économie importante de sang de donneurs.

Ce sang provenant de placentas humains n'est toutefois pratiquement pas utilisable pour la transfusion directe, en raison justement de l'hémoglobine qui s'y trouve et qui constitue une impureté supplémentaire, hémoglobine qui se trouve totalement mise en solution au moment où les placentas sont conservés dans des réfrigérateurs, à des températures de l'ordre de — 5° à — 30 °C, et où toutes les hématies contenues dans le sang éclatent de ce fait.

Dans le cas de sang extrait de placentas congelés, l'hémoglobine peut représenter plus de 50 % des protéines que l'on peut extraire.

Pour éliminer cette hémoglobine, le procédé suivant la présente invention prévoit, qu'il s'agisse de solutions de gamma globuline ou d'autres protéines sériques, une adsorption de l'hémoglobine et de ses dérivés sur résines échangeuses d'ions du type diéthyl-amino-éthyl avec un support de dextran ou de cellulose.

Dans la pratique, si l'on opère à des conditions de pH convenables et avec une dilution appropriée des solutions de protéines, l'hémoglobine est fixée entièrement sur de telles résines, alors que les protéines passent presque entièrement à travers ces résines.

Dans le cas de la gamma globuline, on part d'un produit purifié par fractionnement à l'alcool par exemple, ou par toute autre méthode classique ou même d'un produit purifié après un fractionnement par relargage par les sels.

Les solutions de gamma globuline sont diluées de préférence jusqu'à une concentration de l'ordre de 20 g pour mille, bien qu'une telle dilution ne soit pas absolument impérative.

Pour que l'adsorption se fasse dans les meilleures conditions, il est toutefois nécessaire d'obtenir une force ionique faible et inférieure à 0,100, et de plus il faut opérer à un pH voisin de 8.

Le traitement se fait soit en bain, soit en colonne. On peut ajouter simplement la substance régénérée, mise en cycle anionique type Cl ou phosphate, directement dans la solution de gamma globuline et agiter ensuite cette solution fortement pendant plusieurs heures, 2 à 4 h par exemple, jusqu'à adsorption totale de l'hémoglobine et fixation de cette dernière sur la résine.

Dans le cas où l'on opère en colonne, on met la résine sous forme humide dans une colonne de chromatographie, et l'on fait circuler la solution de gamma globuline, à travers cette résine, de façon à provoquer l'adsorption de l'hémoglobine au fur et à mesure de l'écoulement de cette solution.

Pour concentrer ensuite la solution de gamma globuline ainsi obtenue et dont la grande pureté peut être vérifiée par électrophorèse, on peut employer, soit la lyophilisation ou la dessiccation sous vide, soit le relargage par le sulfate d'ammonium à 200 g/litre, suivi d'une dialyse, soit encore une précipitation par l'alcool à basse température à -5° en employant 27 % d'alcool et en opérant à pH 6,8, le précipité alcoolique obtenu étant ensuite séparé par les méthodes classiques et étant lyophilisé de façon à obtenir une poudre sèche.

On va donner ci-après quelques indications complémentaires sur les résines échangeuses d'ions qui peuvent être utilisées pour adsorber l'hémoglobine, ses dérivés, et les pigments contenus dans ces produits.

Comme on l'a dit plus haut, l'échangeur d'anion est du type diéthyl-amino-éthyl et cet échangeur est fixé sur une substance insoluble, qui est un polymère des sucres, tel que l'amidon ou que la cellulose et le dextran cités plus haut.

On sait que la cellulose est facile à préparer par la technique décrite par Peterson et Sober dans le *Journal de la Société Chimique Américaine* (1956-28-751).

Toutefois, la cellulose, si elle est facile à préparer, présente par contre l'inconvénient de se gonfler beaucoup et de provoquer une perte de rendement par imbibition des résines.

C'est pourquoi on préfère en général utiliser le diéthyl-amino-éthyl dextran dont le coefficient de gonflement est moindre et qui permet d'obtenir un rendement plus élevé, mais tous les polymères des sucres sont en principe utilisables, la manipulation de certains d'entre eux pouvant être simplement plus commode.

Premier exemple. — On prend une solution de gamma globuline colorée provenant d'un fractionnement en solution concentrée entre 10 et 20 % :

On la dilue jusqu'à une concentration en protéines sensiblement égale à 20 g par litre;

On ajoute ensuite peu à peu sous forte agitation 2 g par litre de diéthyl-amino-éthyl dextran, et on laisse la température remonter aux alentours de 25 à 28° , en maintenant l'agitation;

On refroidit éventuellement si la température dépasse 30° ;

On ajuste le pH de la solution en contrôlant la valeur à l'aide d'un pH mètre à électrode de verre et électrode de référence au Calomel, jusqu'à obtention d'un pH exactement égal à 8,0 au moyen de soude Normale;

On poursuit l'agitation de la solution pendant quatre heures en corrigeant le pH si celui-ci vient à varier.

Au bout de ce temps, on centrifuge, ou on filtre, pour obtenir un liquide clair. L'hémoglobine est alors fixée complètement sur la résine.

On concentre à nouveau le liquide décoloré ainsi obtenu pour la commodité de l'emploi.

Pour cela, on ajuste le pH à 7,0 et on refroidit à 0°C :

On ajoute goutte à goutte de l'alcool froid pour porter la concentration alcoolique à une valeur comprise entre 25 et 30 % par exemple 40 litres d'alcool à 96° refroidi à -20°C pour 100 litres de liquide dont la température est maintenue à 0°C .

Durant l'addition d'alcool, la température de la solution tombe de 0 à -5° en restant au voisinage de son point de congélation. On recueille ensuite le précipité insoluble par centrifugation en centrifugeuse réfrigérée à -5° en appliquant une force centrifuge de 20 000 g pendant 15 mn.

La pâte recueillie peut être enfin desséchée sous vide par lyophilisation de façon à obtenir une poudre très pure de gamma globuline.

Il y a lieu de noter que les résines employées peuvent servir plusieurs fois à la condition de les régénérer par la technique suivante :

Régénération des résines :

1^o La résine ayant servi à une adsorption est conservée sur ClNa en solution aqueuse saturée à $+4^{\circ}$.

Pour cinq traitements consécutifs on ajoute à chaque fois de 450 à 500 g de résine dans 30 litres d'eau distillée additionnée de 10,500 kg de chlorure de sodium.

On agite chaque fois pour faire déposer la résine et on maintient la solution à $+4^{\circ}$.

2^o Lorsqu'on a rassemblé sous forme de gel une quantité correspondant à 2,500 kg de résine sèche par exemple, dans la solution de chlorure de sodium saturée, on porte le volume à 180 litres en ajoutant de l'eau distillée. On agite fortement pendant 15 mn, on laisse décanter, et on rejette le surnageant.

3^o On remet en suspension dans 180 litres de

solution de ClNa 50 g/litre, on laisse décanter à $+4^\circ$ pendant une nuit, et on rejette le surnageant.

4° On recommence l'opération au moins six fois en laissant décanter à chaque fois.

5° *Traitement à l'acide acétique :*

Après avoir décanté le surnageant on le remplace par 150 litres d'eau distillée puis on ajoute de l'acide acétique de manière à obtenir un pH de 5,5 à 6,0 (soit 600 ml environ d'acide acétique pur) et on laisse en contact pendant une nuit à $+4^\circ$.

6° Le lendemain on décante le surnageant, et on le remplace par 150 litres d'eau distillée qu'on laisse en contact pendant une nuit à $+4^\circ$.

7° *Traitement à l'acide chlorhydrique :*

Cette opération doit être faite obligatoirement dans la journée, sinon il y a destruction de la résine.

Le matin, on décante le surnageant de l'opération de lavage 6 et on le remplace par 150 litres d' HCl 0,5 N, en employant un mélange préparé séparément de :

6 600 ml de HCl pur et de la quantité d'eau permutée nécessaire pour obtenir 150 litres.

On agite fortement à l'agitateur mécanique pendant une heure, on laisse décanter jusqu'à l'après-midi.

8° On rejette alors le surnageant que l'on remplace par 150 litres d'eau permutée. On agite pendant 5 à 10 mn, et on laisse décanter pendant une nuit à $+4^\circ\text{C}$.

9° On renouvelle l'opération précitée de lavage à l'eau permutée au moins trois fois, en éliminant à chaque fois le surnageant par décantation ou essorage.

10° Après avoir éliminé le surnageant on ajoute ensuite 50 litres d'alcool dénaturé. On agite fortement et on laisse en contact pendant une nuit.

11° Après essorage on procède à un deuxième lavage à l'alcool sous agitation, et on récupère la résine par essorage.

12° On étend ensuite la résine essorée sur papier filtre et on la sèche pendant une nuit à 50°C .

N.B. Il est nécessaire d'opérer constamment au-dessous de 80°C , pour ne pas risquer de détruire la résine.

Deuxième exemple. — Traitement en colonne :

On prend 10 litres de solution aqueuse de gamma globuline à 20 g/litre contenant au maximum 0,50 g/litre de chlorure de sodium;

On ajuste le pH à 8,0;

On prend par ailleurs 20 g de diéthyl-amino-éthyl, dextran, que l'on met en suspension dans 20 litres d'eau distillée, en agitant le mélange;

Après avoir ajusté le pH à 8,0 au moyen de soude N, on centrifuge la suspension et l'on remet

le gel sédimenté en suspension dans 10 litres d'eau distillée;

On verse ensuite la suspension dans une colonne de chromatographie et on laisse écouler l'eau excédentaire;

On fait alors passer progressivement la solution aqueuse de gamma globuline à travers la colonne, et on recueille après adsorption et passage sur la colonne, un liquide complètement décoloré, qui ne renferme que la gamma globuline, la solution ayant laissé dans la colonne la totalité de l'hémoglobine qu'elle contenait.

Le liquide est ensuite concentré à nouveau dans les mêmes conditions qu'au premier exemple.

Il est bien entendu que l'on peut apporter aux modes de mise en œuvre du procédé de séparation de protéines sériques objet de l'invention, divers changements, perfectionnements ou additions, ou remplacer certains corps par des corps équivalents sans altérer pour cela l'économie générale de l'invention.

RÉSUMÉ

La présente invention a pour objet un procédé perfectionné de séparation de protéines sériques et notamment de gamma globuline à partir de placentas humains éventuellement congelés ou de sang hémolysé, ledit procédé permettant d'obtenir à partir desdits placentas ou dudit sang hémolysé des protéines sériques absolument incolores et notamment de la gamma globuline ce procédé étant en outre caractérisé par le fait qu'après avoir obtenu par une méthode de fractionnement classique, une solution colorée de protéine sérique et notamment de gamma globuline, on soumet ladite solution éventuellement diluée, à l'action de résines échangeuses d'ions du type diéthyl-amino-éthyl fixées sur un polymère insoluble des sucres, de façon à faire adsorber la totalité de l'hémoglobine et des dérivés contenus dans ladite solution par lesdites résines échangeuses d'ions, ledit procédé pouvant comporter en outre les caractéristiques suivantes considérées isolément ou en combinaison :

a. On dilue préalablement ladite solution colorée jusqu'à une concentration en protéine sensiblement égale à 20 g par litre;

b. On effectue l'adsorption à un pH voisin de 8;

c. On dilue les solutions de protéines sériques jusqu'à l'obtention d'une force ionique inférieure à 0,100;

d. On effectue l'adsorption en bain sous forte agitation pendant plusieurs heures;

e. On met la résine en cycle anionique type Cl ou phosphate;

f. On met la résine échangeuse d'ions sous forme humide dans une colonne de chromatographie, à

l'intérieur de laquelle on fait circuler la solution de protéine sérique;

g. On concentre la solution de gamma globuline décolorée par lyophilisation;

h. On concentre la solution de gamma globuline décolorée par dessiccation sous vide;

i. On concentre la solution de gamma globuline décolorée par relargage par le sulfate d'ammonium à 200 g par litre suivi d'une dialyse;

j. On concentre la solution de gamma globuline décolorée par précipitation par l'alcool à basse

température, de l'ordre de -5° , en employant 27 % d'alcool et en opérant à pH 6,8 et on soumet ensuite le précipité alcoolique obtenu à une lyophilisation;

k. On utilise comme support de la résine échangeuse d'ions le dextran.

Société anonyme dite : INSTITUT MÉRIEUX

Par procuration :

Alain CASALONGA