

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 80 25363

(54)

Appareil d'électrodialyse et procédé de fractionnement de mélanges de protéines.

(51)

Classification internationale (Int. Cl. ³). B 01 D 13/02; A 61 K 37/02.

(22)

Date de dépôt..... 28 novembre 1980.

(33) (32) (31)

Priorité revendiquée : EUA, 10 janvier 1980, n° 111 144.

(41)

Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 29 du 17-7-1981.

(71)

Déposant : Société dite : IONICS, INC., résidant aux EUA.

(72)

Invention de : Surendar Mohan Jain.

(73)

Titulaire : *Idem* (71)

(74)

Mandataire : Cabinet Bert, de Keravenant et Herrburger,
115, bd Haussmann, 75008 Paris.

L'invention concerne un appareil d'électrodialyse et un procédé de fractionnement de mélanges de protéines. Plus précisément, l'invention concerne la séparation de mélanges complexes de protéines par électrodialyse de ces mélanges de manière à abaisser leur concentration en ions (sel), puis ensuite le refroidissement, le filtrage et/ou le réglage du pH, et enfin la récupération des électrolytes perdus (ions) et de l'eau, en particulier lorsqu'il s'agit d'un échange de plasma effectué sur place.

Les fluides biologiques tels que le plasma ou le sérum du sang, le lait, le petit-lait, l'urine, etc... contiennent un mélange de diverses protéines. Par exemple, le plasma sanguin contient de l'albumine (3,5 à 4,5 g/100 ml), du fibrinogène (0,20 à 0,45 g/100 ml), de la globuline α (0,4 à 1 g/100 ml), de la globuline β (0,8 g/100 ml), de l'immunoglobuline - IgG (0,8 à 1,8 g/100 ml), IgD (0,015 g/100 ml) IgA (0,09 à 0,45 g/100 ml), IgM (0,06 à 0,25 g/100 ml) etc.. (Frank W. Putnam, The Trace Components of Plasma, An Overview). Les immunoglobulines (Ig) sont très importantes, car elles entrent en jeu dans les mécanismes de protection et de défense contre les organismes infectieux.

Les troubles cliniques caractérisés par des déséquilibres de ces systèmes de protéines, soit dans la faculté de reconnaître un mécanisme d'invasion, soit dans la faculté de se reconnaître eux-mêmes, ont été à l'origine de la compréhension des aspects cliniques de l'immunologie. On sait, en effet, que des réactions immunologiques anormales produisent un large spectre de maladies. Parmi les maladies liées à des réactions immunologiques complexes, on peut, par exemple, citer la maladie du sérum, la glomérulonéphrite et la gravis myasténique. La plasmaphorèse est une technique utilisée pour réduire, freiner ou stopper le processus immunopathologique associé à la circulation d'un anticorps humoral et/ou de composés immunologiques complexes du plasma (Glassman, Rationale for Plasmapheresis, "Plasma Therapy", Vol. 1, N° 1, Page 13 (1979)).

Un procédé connu consiste à effectuer la plasmaphorèse d'environ 4 litres de plasma pendant une période de 2 à 4 heures. Le plasma ponctionné sur le patient est généralement jeté et remplacé par de l'albumine et, soit du sérum physiologique, soit une solution de Ringer, pour obtenir l'équilibre

entre les protéines, l'électrolyte et l'eau. Ce procédé est très cher et laisse parfois le patient dans un état d'hypoimmunologie. Dans un autre procédé, la reconstitution du plasma éliminé se fait en apportant du plasma congelé frais. Ce procédé, bien que
5 moins cher, présente cependant des risques de transmission de virus d'hépatite au patient.

Le procédé selon l'invention permet de pallier ces inconvénients en éliminant sélectivement les euglobulines ou les mélanges complexes d'euglobulines et d'antigènes produisant
10 la maladie ou résultant de celle-ci, tout en reconstituant en même temps la majeure partie de l'albumine, de l'électrolyte (sel) et de l'eau pour restituer ainsi au patient son propre plasma (sans antigène IgG) avec un équilibre approprié entre les protéines, le sel et l'eau. Cette technique rend l'échange
15 moins cher et réduit considérablement les risques d'hépatite puisqu'elle ne nécessite pas de quantités additionnelles d'albumine, de sel, d'eau ou de plasma d'un donneur.

L'invention sera décrite ci-après en prenant comme principal exemple, celui des protéines de sérum mais l'in-
20 vention ne se limite bien entendu pas à cette application particulière et son domaine s'étend à d'autres fluides biologiques ou d'autres protéines.

Le procédé selon l'invention permet ainsi d'obtenir un produit pouvant s'utiliser sur place sans la moindre
25 modification supplémentaire de la teneur en sel, en protéines ou en eau, tandis qu'au contraire, les produits, selon l'art antérieur (Brown, Brevet USA N° 3 579 441) nécessitent une reconstitution de sels et d'eau avant de pouvoir administrer de nouveau les protéines au patient, ou un traitement au froid
30 (au-dessous de 15°C) et des étapes de purification supplémentaires (Stern 3 972 791).

L'invention concerne l'application de l'électrodialyse au fractionnement ou à la séparation partielle de mélanges de protéines avec reconstitution ultérieure de leur équi-
35 bre en sel et en eau. Les mélanges de protéines comprennent essentiellement (mais pas exclusivement) du plasma, du sérum ou des dérivés de ces éléments. Le processus d'électrodialyse produit l'extraction des sels dissous (ions) et par suite, on obtient un précipité des euglobulines ou de leurs composés en con-
40 trôlant à la fois leur concentration ionique, leur température

et leur pH. L'albumine et les autres protéines qui ne sont pas par nature de l'euglobuline, ne précipitent pas dans une solution à faible teneur en sel et restent en solution pour revenir ensuite au patient. Après extraction des précipités d'euglobuline, on rétablit la concentration ionique du plasma en utilisant le plasma dessalé comme courant de réception de sel dans la colonne ou module d'électrodialyse. On peut alors restituer le plasma au patient sans autre modification de la teneur en sel ou en eau.

Plus précisément, l'invention concerne un procédé de fractionnement de mélanges de protéines liquides contenant des sels dissous par utilisation d'un appareil d'électrodialyse muni d'une ou plusieurs paires de chambres de concentration et de dilution, ces chambres étant définies par des membranes alternées d'échanges d'anions et de cations situées entre des électrodes terminales d'anode et de cathode, procédé caractérisé en ce qu'il consiste à faire passer le mélange de protéines dans les chambres de dilution, à appliquer un courant continu aux bornes des électrodes pour réduire la teneur en sel de ce mélange de protéines en faisant passer le sel des chambres de dilution aux chambres de concentration; à recueillir le mélange de protéines dessalées dans les chambres de dilution; à séparer et à extraire un ou plusieurs éléments de protéines du mélange de protéines dessalé et à faire passer ensuite le mélange dessalé obtenu dans les chambres de concentration, grâce à quoi les sels pénétrant dans les chambres de concentration à partir des chambres de dilution adjacentes reconstituent exactement la teneur en sel initiale du mélange de protéines dessalé.

Le procédé décrit ci-dessus s'applique particulièrement bien lorsque le mélange liquide de protéines, est du plasma sanguin ou du sérum, et lorsque les éléments de protéines extraits sont des euglobulines et/ou des composés complexes de celles-ci.

Une variante de mise en oeuvre du procédé décrit ci-dessus, consiste à recueillir le mélange de protéines dessalé dans les chambres de dilution de la colonne d'électrodialyse, à extraire un ou plusieurs des éléments de protéines du mélange de protéines dessalé, et à recycler ensuite le mélange dessalé obtenu dans les chambres de dilution. On inverse alors la polarité du courant continu de façon que les chambres de dilution conte-

nant le mélange dessalé deviennent des chambres de concentration ou de réception de sels, et de façon que les chambres de concentration contenant les sels deviennent des chambres de dilution ou de dessalement. Les sels transférés aux chambres de concentration rétablissent alors exactement la concentration initiale en sel et en eau du mélange de protéines dessalé.

L'électrodialyse (ED) est très largement utilisée pour le dessalement de solutions aqueuses : eau saumâtre, petit-lait, lait (voir brevets U.S.A. 3 433 726, 3 447 939, 3 595 766, 3 757 005, 3 754 650, etc...). Ces brevets ne concernent que la réduction de la teneur en sel d'un liquide, mais n'utilisent pas le processus d'électrodialyse (ED) dans un système complexe de fractionnement et d'équilibrage de la teneur en sel et en eau d'un mélange de protéines, comme c'est le cas dans les applications thérapeutiques telles que la plasmaphorèse.

La technologie du dessalement dans une colonne échangeuse d'ions a été utilisée dans le passé pour produire une précipitation et pour fractionner ainsi les protéines du plasma (brevets U.S.A. 3 234 199, 3 073 744). Cependant, la souplesse de ce processus est très limitée et les colonnes sont difficiles à manipuler, à nettoyer et à stériliser lorsqu'on les utilise dans les conditions nécessaires pour obtenir le fractionnement des protéines.

On a constaté maintenant que l'électrodialyse pouvait s'utiliser non seulement dans le fractionnement des protéines par suite du processus de dessalement, mais aussi, ce qui est beaucoup plus important, pour rétablir l'équilibre en électrolyte (sel) et en eau des mélanges de protéines dessalés obtenus afin de pouvoir les restituer au patient avec pratiquement tous les sels initiaux. La combinaison des techniques décrites ici, comprend l'électrodialyse du mélange de protéines, le contrôle de la température et du pH, la séparation de certaines protéines, puis la reconstitution de l'équilibre en sel et en eau du mélange. Ce nouveau procédé augmente de manière inattendue le rendement de chaque étape et rend le processus extrêmement utile, en particulier pour soigner les patients sur place par plasmaphorèse, lorsqu'il faut extraire les euglobulines ou leurs composés et reconstituer en même temps la teneur en sel initiale du plasma. Ce procédé permet, non seulement d'éviter les dépenses de remplacement de l'albumine et du sel, mais en-

core de supprimer les risques de provoquer une hépatite par apport de plasma nouveau congelé.

L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description détaillée qui suit et qui se réfère aux dessins
5 ci-joints, dans lesquels :

- la figure 1 représente le schéma de principe d'une première forme de réalisation du procédé et de l'appareil selon l'invention,

- la figure 2 est un schéma de principe d'une
10 seconde forme de réalisation du procédé et de l'appareil selon l'invention.

Sur les figures 1 et 2, les mêmes éléments sont repérés par les mêmes références. Sur ces figures, le fluide soumis au traitement est du plasma, mais il est évident que ce fluide
15 peut être constitué par n'importe quel autre mélange de protéines.

Comme indiqué sur la figure 1, le sang citraté ou héparinisé 1 est ultra-filtré et/ou centrifugé en 2, de manière à séparer et à éliminer les globules rouges 3 ou toutes autres
20 particules en suspension, et le plasma restant 15 est envoyé dans une colonne d'électrodialyse (ED) 4, telle que celle fabriquée par Ionics, Inc., Watertown, MA. Les équipements d'électrodialyse et leur processus de fonctionnement sont décrits plus en détail dans les brevets U.S.A. 2 848 403, 2 863 813, 3 003 940,
25 3 341 441, 4 115 225 et autres. Une telle colonne comprend normalement une ou plusieurs paires de chambres de concentration et de dilution séparées par des membranes alternées d'échange d'anions et de cations. Ces chambres sont situées entre une anode et une cathode.

30 On fait, de préférence passer une solution d'électrolyte dans les chambres de cathode et d'anode pour que le courant électrique puisse traverser les chambres de concentration et de dilution. Généralement, une chambre de concentration isole les solutions d'électrodes des produits obtenus ou des
35 chambres de dilution. Les membranes à sélectivité ionique sont soigneusement choisies de manière à réduire au minimum tout transfert de composés moléculaires légers tels que des sucres du sang. Les débits de fluide dans la colonne et le courant appliqué sont réglés avec soin pour éviter toute variation excessive de pH.
40

Le plasma pénètre et passe dans les chambres de dilution et, lorsqu'on applique un courant continu entre les électrodes, le sel ou la teneur en ions du plasma diminue par suite du passage du sel dans les chambres de concentration adjacentes, ces chambres pouvant être dotées initialement, d'une petite quantité de plasma ou d'albumine. Le plasma dessalé obtenu 5 est collecté dans les chambres de dilution (non représentées) et passe à travers des moyens permettant de séparer et d'extraire une ou plusieurs protéines (euglobulines et composés de 10 celles-ci dans le cas présent). Les moyens de séparation peuvent par exemple être constitués par un échangeur de chaleur 6 permettant d'abaisser les températures, et par un appareil de centrifugation et/ou d'ultra-filtrage 7.

Après extraction des euglobulines ou autres protéines précipitées 17, le mélange dessalé 8 pénètre et passe dans les chambres de concentration (non représentées) de la colonne d'électrodialyse (ED), ce qui lui permet ainsi de recevoir les sels en provenance des chambres de dilution adjacentes et de retrouver par conséquent sa teneur en sel initiale. Ce mélange 9 20 ayant retrouvé sa teneur en sel, passe ensuite à travers un échangeur de chaleur 10 permettant, lorsque cela est nécessaire, de régler la température du mélange à celle du corps humain, puis on restitue ensuite à ce mélange les globules rouges 3 précédemment séparés du plasma. Ce sang reconstitué 12 peut alors 25 être restitué au patient 14, sans le moindre apport d'albumine ou de sels extérieurs. Le processus se suffit ainsi à lui-même et peut fonctionner sur place pour permettre des échanges thérapeutiques de plasma.

Si la température du plasma reste comprise dans 30 une plage de l'ordre de 15° à 40°C pendant l'électrodialyse, et si le rapport (CD/N) de la densité de courant (CD) à la teneur en sel (N) reste compris dans une plage de 300 à 500 $\frac{\text{mA/cm}^2}{\text{eq./litre}}$ le précipité obtenu (même en cas de dessalement complet) est très fin et ne risque donc pas de boucher éventuellement les 35 chambres de la colonne d'électrodialyse (ED).

Une autre forme de réalisation de l'appareil et du procédé selon l'invention, est représentée sur la figure 2. Là encore le fluide utilisé est du sang 1, mais ce fluide peut être constitué par n'importe quel autre mélange de protéines. 40 Il peut être nécessaire ou non d'ajouter du citrate ou de l'hé-

parine, simplement pour maintenir au minimum la coagulation du sang pendant le traitement. Ici encore, le sang héparinisé ou citraté est ultra-filtré ou centrifugé en 2, puis envoyé à une colonne d'électrodialyse (ED) 4 identique à celle décrite dans le premier exemple ci-dessus.

On introduit le plasma dans les chambres de dilution et le passage d'un courant continu dans la colonne 4 permet de faire passer dans les chambres de concentration les sels extraits du plasma. Le mélange dessalé 5 sortant des chambres de dilution passe à travers un échangeur de chaleur 6 permettant de refroidir le plasma, et le précipité obtenu est séparé en 17 par un appareil d'ultra-filtrage ou de centrifugation 7. Le liquide dessalé qui surnage 8 est alors envoyé à la chambre de dilution d'une colonne d'électrodialyse 18.

Pour rendre plus claire cette seconde opération, on a représenté une autre colonne d'électrodialyse 18 (en pratique il peut s'agir de la colonne initiale 4) dans laquelle le courant de concentration 19 de la colonne d'électrodialyse 4 forme l'autre courant. La polarité de la colonne 18 est inverse de celle de la colonne 4, ce qui permet de faire revenir au plasma dessalé les sels provenant du concentré, en rétablissant ainsi l'équilibre de la teneur en sel. Ce plasma 9 passe alors dans un échangeur de chaleur 10 puis on lui restitue ses globules rouges 3 pour le réinjecter au patient 14. Ce dernier procédé offre ainsi une variante de conception à celui décrit sur la figure 1.

EXEMPLE 1 -

Cet exemple illustre le rétablissement de l'équilibre entre l'électrolyte et l'eau dans un plasma dessalé, par utilisation de nouveau plasma non salé, dans le courant de fluide dilué.

L'appareil utilisé était une colonne d'électrodialyse de laboratoire n'utilisant qu'une seule paire de cellules (c'est-à-dire une chambre de dilution et une chambre de concentration). On a utilisé comme débits d'électrodes, une solution de $0,2 \text{ N Na}_2 \text{ SO}_4$ pour conduire le courant électrique. On a utilisé 360 ml de plasma citraté non salé dans le courant de dilution, et 340 ml de plasma dessalé dans le courant de concentration, ce courant de concentration étant celui qui reçoit les sels. Les valeurs de CD/N utilisées ont été de

400 $\frac{\text{mA}}{\text{cm}^2}$ eq./litre . L'évolution du traitement est résumée dans le tableau ci-dessous, la température étant maintenue entre 15° et 20°C pendant ce traitement et les débits étant de l'ordre de 90 ml/min par paire de cellules; la surface effective d'une

5

		courant dilué				courant concentré (phase dessalée)			
Temps:		: valeurs de	pH	: vol		: valeurs	pH	: vol	
min.:	Amp.:	conductivité:		:(ml)		de conducti-		:(ml)	
						vité			
10	0	: 17	: 16.500	: 8,2	: 360	: 30	: 5,2	: 340	
	6	: 8,8	: 8.600	: 7,4	: 352	: 8.500	: 7,2	: 347	
	12	: 4,4	: 4.300	: 6,9	: 347	: 12.400	: 7,7	: 350	
	25	: 0,9	: 825	: 6,1	: 344	: 15.600	: 8,0	: 353	
15	35	: 0,2	: 33	: 5,2	: 342	: 16.400	: 8,3	: 355	

Ainsi, le plasma dessalé du courant de concentration a été ramené à une valeur de conductivité comparable à celle du plasma citraté non salé initial, l'équilibrage de la teneur en eau ayant été rétabli. Les conductivités ci-dessus

20

EXEMPLE II -

Cet exemple est semblable à l'exemple I ci-dessus sauf le fait qu'on utilise le plasma dessalé dans le courant dilué et que le courant de concentration est une solution aqueuse contenant les sels extraits d'une première opération de dessalement. La polarité du courant est inversée et les sels en provenance du courant d'eau salée sont transférés au plasma dessalé pour ramener les sels de ce plasma à leur concentration

25

30

initiale.

RE V E N D I C A T I O N S

1.- Procédé de fractionnement de mélanges de protéines liquides (15) contenant des sels dissous par utilisation d'un appareil d'électrodialyse (4) muni d'une ou plusieurs paires de chambres de concentration et de dilution, ces chambres étant définies par des membranes alternées d'échanges d'anions et de cations, situées entre des électrodes terminales d'anode, et de cathode, procédé caractérisé en ce qu'il consiste à faire passer le mélange de protéines (15) dans les chambres de dilution, à appliquer un courant continu aux bornes des électrodes pour réduire la teneur en sel de ce mélange de protéines en faisant passer le sel des chambres de dilution aux chambres de concentration; à recueillir le mélange de protéines déssalées (5) dans les chambres de dilution; à séparer et à extraire un ou plusieurs éléments de protéines du mélange de protéines déssalé et à faire passer ensuite le mélange déssalé obtenu (8) dans les chambres de concentration, grâce à quoi les sels pénétrant dans les chambres de concentration à partir des chambres de dilution adjacentes reconstituent exactement la teneur en sel initiale du mélange de protéines déssalé.

2.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la mélange de protéines liquide (15) est choisi dans le plasma et/ou le sérum du sang, les éléments de protéines extraits (17) étant choisis parmi les globulines et les euglobulines.

3.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, pour le fractionnement de mélanges de protéines liquides contenant des sels dissous par utilisation d'un appareil d'électrodialyse (4) muni d'une ou plusieurs paires de chambres de concentration et de dilution, ces chambres étant définies par des membranes alternées d'échanges d'anions et de cations, situées entre des électrodes terminales d'anode et de cathode, procédé caractérisé en ce qu'il consiste à faire passer le mélange de protéines (15) dans les chambres de dilution; à appliquer un courant continu aux bornes des électrodes pour réduire la teneur en sel de ce mélange de protéines en faisant passer le sel des chambres de dilution aux chambres de concentration; à recueillir le mélange de protéines déssalées (8) dans les chambres de dilution; à séparer et à extraire un ou plusieurs éléments de protéines (17) du mélange de protéines déssalé; à recycler ensuite le mélange déssalé (8) en le ramenant dans les chambres de dilution; et à inverser la

polarité du courant continu de façon que les chambres de dilution contenant le mélange dessalé deviennent maintenant des chambres de concentration en sel, et que les chambres de concentration contenant les sels deviennent maintenant des chambres de dilution, grâce à quoi les sels entrent dans une chambre de concentration, en provenant des chambres de dilution adjacentes, pour reconstituer exactement la teneur en sel initiale du mélange de protéines dessalé.

4.- Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le mélange de protéines liquide (15) est choisi dans le plasma et/ou le sérum du sang et en ce que les éléments de protéines extraits (17) sont choisis parmi les globulines et les euglobulines.

5.- Appareil de fractionnement de mélanges de protéines liquides (15) contenant des sels dissous, permettant de mettre en oeuvre le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, appareil caractérisé en ce qu'il comprend en combinaison, un appareil d'électrodialyse (4) muni d'une ou plusieurs paires de chambres de concentration et de dilution, ces chambres étant définies par des membranes alternées d'échanges d'anions et de cations situées entre des électrodes extrêmes d'anode et de cathode, des moyens pour faire passer le mélange de protéines (15) dans les chambres de dilution, des moyens pour faire passer un courant continu entre les électrodes, pour réduire ainsi la teneur en sel du mélange de protéines en faisant passer le sel des chambres de dilution aux chambres de concentration ; des moyens pour recueillir le mélange de protéines dessalé (5) dans les chambres de dilution; des moyens (6, 7) pour séparer et extraire un ou plusieurs éléments de protéines (17) du mélange de protéines dessalé (5) et des moyens de conduit permettant de faire passer le mélange dessalé obtenu (8) dans les chambres de concentration, grâce à quoi les sels pénétrant dans une chambre de concentration et provenant des chambres de dilution adjacentes, reconstituent exactement la teneur en sel initiale du mélange de protéines dessalé.

6.- Appareil selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il comprend en combinaison un appareil d'électrodialyse (4) muni d'une ou plusieurs paires de chambres de concentration et de dilution, ces chambres étant définies par des membranes alternées d'échanges d'anions et de cations situées entre des électrodes extrêmes d'anode et de cathode; des moyens pour faire passer le mélan-

ge de protéines (15) dans les chambres de dilution, des moyens pour faire passer un courant continu entre les électrodes pour réduire ainsi la teneur en sel du mélange de protéines en faisant passer le sel des chambres de dilution aux chambres de concentration; des moyens pour recueillir le mélange de protéines dessalé (5) dans les chambres de dilution; des moyens (6,7) pour séparer et extraire un ou plusieurs éléments de protéines (17) du mélange de protéines dessalé; des moyens de conduit permettant de recycler le mélange de protéines dessalé obtenu (8) en le ramenant dans les chambres de dilution; et des moyens pour inverser la polarité du courant continu de façon que les chambres de dilution contenant le mélange dessalé, deviennent maintenant des chambres de concentration, et de façon que les chambres de concentration contenant les sels, deviennent maintenant des chambres de dilution; grâce à quoi les sels pénétrant dans ces chambres de concentration, en provenance des chambres de dilution adjacentes, rétablissent exactement la teneur en sel initiale du mélange de protéines dessalé.

7.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le mélange de protéines (15) est entièrement à base de sang traité par des anticoagulants, les cellules de sang en suspension étant ensuite séparées avant l'opération de dessalement.

8.- Appareil selon l'une quelconque des revendications 5 et 6, caractérisé en ce que le mélange de protéines est entièrement du sang et en ce que les moyens d'anticoagulation et de séparation ultérieure des cellules de sang en suspension, sont mis en oeuvre avant de faire passer le mélange de protéines dans la chambre de dilution.

