(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

COURBEVOIE

(11) **N° de publication :** ***3 088 541***

(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) **N° d'enregistrement national :** **18 60544**

(51) Int Cl[8] : ***A 61 K 31/700*** *(2019.01), A 61 K 31/70, 31/095*

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt :** 15.11.18.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 22.05.20 Bulletin 20/21.

(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 :**

( ) **Demande(s) d'extension :**

(71) **Demandeur(s) :** *LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES SA* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** DE LARICHAUDY JOFFREY et CAZALON NEMORIN SANDY.

(73) **Titulaire(s) :** LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES SA.

(74) **Mandataire(s) :** LAVOIX.

(54) PROCEDE DE CONSERVATION DE CELLULES A VISEE THERAPEUTIQUE.

(57) La présente invention se rapporte à une composition comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable :

a) au moins un saccharide,
b) au moins une vitamine,
c) au moins un acide aminé,
d) au moins un antioxydant, et
e) des cellules à visée thérapeutique,

ladite composition ayant un pH compris entre 7.0 et 8.5, de préférence entre 7.0 et 8.3. Elle se rapporte également à un procédé de conservation d'un échantillon de cellules à visée thérapeutique, comprenant au moins une étape de mélange de l'échantillon de cellules à visée thérapeutique avec les ingrédients a) à d) ci-dessus et un milieu physiologiquement acceptable, la composition ainsi obtenue ayant un pH compris entre 7.0 et 8.5, de préférence compris entre 7.0 et 8.3.

FR 3 088 541 - A1

Procédé de conservation de cellules à visée thérapeutique

La présente invention concerne une composition comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable :

a) au moins un saccharide,

b) au moins une vitamine,

c) au moins un acide aminé,

d) au moins un antioxydant, et

e) des cellules à visée thérapeutique,

ladite composition ayant un pH compris entre 7.0 et 8.5, de préférence entre 7.0 et 8.3.

La présente invention se rapporte également à un procédé de conservation d'un échantillon de cellules à visée thérapeutique, comprenant au moins une étape de mélange de l'échantillon de cellules à visée thérapeutique avec :

a) au moins un saccharide,

b) au moins une vitamine,

c) au moins un acide aminé,

d) au moins un antioxydant, et

un milieu physiologiquement acceptable,

la composition ainsi obtenue ayant un pH compris entre 7.0 et 8.5, de préférence compris entre 7.0 et 8.3.

La présente invention se rapporte également à l'utilisation d'une composition comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable :

a) au moins un saccharide,

b) au moins une vitamine,

c) au moins un acide aminé,

d) au moins un antioxydant,

et ayant un pH compris entre 7.0 et 8.5, de préférence compris entre 7.0 et 8.3, pour la conservation d'au moins un échantillon de cellules à visée thérapeutique.

La conservation d'échantillons biologiques, notamment dans un but thérapeutique, est un enjeu crucial pour l'industrie pharmaceutique.

En général, le matériel biologique est conservé par la congélation dudit matériel, dans un support approprié, tel qu'un tube ou une ampoule en verre ou en matière plastique

(généralement appelé "paillette" ou tube de congélation dans le domaine de la cryoconservation), ledit support étant adapté pour le stockage à long terme et à basse température ; c'est la cryoconservation.

La cryoconservation pose cependant un certain nombre de problèmes et de contraintes techniques. Notamment, des lésions cellulaires peuvent se produire lors de la décongélation, entraînant l'apoptose ou l'éclatement des cellules. En outre, la survie des cellules cryoconservées peut dépendre des conditions et des techniques employées lors de la congélation. Pour la plupart des cellules de mammifères, comme cela est le cas pour les produits et médicaments de thérapie cellulaire, il est en outre indispensable d'utiliser des cryoprotectants pour préserver l'intégrité et la fonctionnalité cellulaires.

Actuellement, la fabrication à une échelle industrielle (européenne ou mondiale notamment) de produits de thérapie cellulaire pose de nouvelles problématiques, telles que la stabilité du produit fini administré et la variabilité liée à la matière biologique de départ.

Dans la plupart des cas, le produit fini est conditionné :

- frais dans un milieu liquide (type albumine ou solution saline) avec une conservation limitée à quelques heures, ou bien
- congelé dans une formulation simple à base de DMSO, peu stable et peu efficace à long terme. La quantité non négligeable de cellules mortes, de débris aux effets potentiellement immunogènes et la toxicité pour le patient des excipients couramment utilisés sont autant de limites. La plupart du temps, un lavage des cellules avant administration pour retirer ces éléments toxiques (biologiques ou non) est indiqué. Ces solutions ne sont donc pas compatibles avec une distribution industrielle, et offrent peu de flexibilité d'administration et de stockage.

Il existe donc un besoin pour le développement d'un produit et/ou médicament de thérapie cellulaire qui soit stable à long terme (i.e. pendant un, deux, trois jours jusqu'à une semaine), qui soit facile à utiliser, directement injectable et non toxique.
En outre, un tel produit et/ou médicament de thérapie cellulaire doit présenter une viabilité et une fonctionnalité cellulaires préservées.

La présente invention permet de répondre à ce besoin. En effet, la composition selon l'invention permet d'obtenir des produits de thérapie cellulaire comprenant des cellules à

visée thérapeutique, prêts à l'emploi (i.e. prêts à être injectés sans lavage, ce qui évite toutes manipulations supplémentaires provoquant une baisse de viabilité et une perte de cellules), faciles à utiliser et non toxiques. En outre, la composition selon l'invention permet de préserver la viabilité des cellules à visée thérapeutique, et leur fonctionnalité est maintenue (i.e. pendant un, deux, trois jours jusqu'à une semaine).

La présente invention concerne une composition comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable :

a) au moins un saccharide,
b) au moins une vitamine,
c) au moins un acide aminé,
d) au moins un antioxydant, et
e) des cellules à visée thérapeutique,

ladite composition ayant un pH compris entre 7.0 et 8.5, de préférence entre 7.0 et 8.3.

La présente invention se rapporte également à un procédé de conservation d'un échantillon de cellules à visée thérapeutique, comprenant au moins une étape de mélange de l'échantillon de cellules à visée thérapeutique avec :

a) au moins un saccharide,
b) au moins une vitamine,
c) au moins un acide aminé,
d) au moins un antioxydant, et
un milieu physiologiquement acceptable,

la composition ainsi obtenue ayant un pH compris entre 7.0 et 8.5, de préférence compris entre 7.0 et 8.3.

La présente invention se rapporte également à l'utilisation d'une composition comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable :

a) au moins un saccharide,
b) au moins une vitamine,
c) au moins un acide aminé,
d) au moins un antioxydant,

et ayant un pH compris entre 7.0 et 8.5, de préférence compris entre 7.0 et 8.3, pour la conservation d'au moins un échantillon de cellules à visée thérapeutique.

La composition selon l'invention comprend donc, dans un milieu physiologiquement acceptable :

a) au moins un saccharide,

b) au moins une vitamine,

c) au moins un acide aminé,

d) au moins un antioxydant, et

e) des cellules à visée thérapeutique,

En outre, la composition a un pH compris entre 7.0 et 8.5, de préférence entre 7.0 et 8.3.

Selon un mode de réalisation, la composition selon l'invention est directement injectable au patient.

Par « milieu physiologiquement acceptable », on entend un milieu aqueux comprenant des électrolytes. Les électrolytes sont par exemple des sels de sodium, de potassium, de magnésium et/ou de calcium avec des anions de type chlorure, acétate, carbonate, hydrogénocarbonate, hydroxyde ou citrate. De préférence, le milieu physiologiquement acceptable est un milieu aqueux comprenant au moins du chlorure de sodium, du chlorure de potassium et du chlorure de calcium. Selon cette dernière phrase, de préférence, le milieu physiologiquement acceptable comprend en outre de l'acétate de sodium et du citrate trisodique.

Le sodium est de préférence présent dans la composition selon l'invention en concentration comprise entre 130 et 200 mmol/L, de préférence entre 135 et 190 mmol/L, de préférence entre 138 et 188 mmol/L.

Le potassium est de préférence présent dans la composition selon l'invention en concentration comprise entre 0.5 et 5.0 mmol/L, de préférence entre 1.0 et 4.5 mmol/L, de préférence entre 1.5 et 4.0 mmol/L.

Le calcium est de préférence présent dans la composition selon l'invention en concentration comprise entre 0.01 et 10 mmol/L, de préférence entre 0.01 et 1 mmol/L, de préférence entre 0.01 et 0.05 mmol/L.

Le chlorure est de préférence présent dans la composition selon l'invention en concentration comprise entre 40 et 110 mmol/L, de préférence entre 70 et 105 mmol/L, de préférence entre 65 et 100 mmol/L.

Le magnésium est de préférence présent dans la composition selon l'invention en concentration comprise entre 0 et 5 mmol/L, de préférence entre 0.5 et 4.5 mmol/L, de préférence entre 1 et 3.5 mmol/L.

Le milieu physiologiquement acceptable comprend de préférence au moins un sel d'hydrogénocarbonate (HCO_3^-) (appelé aussi bicarbonate). De préférence le milieu physiologiquement acceptable comprend de l'hydrogénocarbonate de sodium.

De préférence, le milieu physiologiquement acceptable est tel que la composition qui le contient a un pH compris entre 7.0 et 8.5, de préférence entre 7.0 et 8.3. En particulier, les ions HCO_3^- sont présents pour ajuster le pH dans cette gamme de valeurs.

De préférence, le bicarbonate est présent dans la composition selon l'invention à une concentration comprise entre 20 et 100 mmol/L, de préférence entre 20 et 80 mmol/L, de préférence entre 20 et 60 mmol/L, de préférence entre 20 et 55 mmol/L.

De préférence, la composition selon l'invention présente une osmolarité comprise entre 250 et 400 mOsm/L, de préférence entre 260 et 390 mOsm/L, de préférence entre 280 et 320 mOsm/L.

La composition selon l'invention comprend au moins un saccharide (composé a)). Le saccharide améliore la survie et la fonction des cellules en préservant l'équilibre osmotique. Une fraction pénètre les cellules et permet de stabiliser les structures membranaires. Le saccharide est de préférence choisi parmi les monosaccharides, les disaccharides et les trisaccharides.

Les monosaccharides sont de préférence choisis parmi le glucose, le galactose, le fructose et le mannose. De préférence, le saccharide est le glucose.

Le disaccharide a de préférence pour formule A-B, dans laquelle A et B sont chacun indépendamment choisis parmi le glucose, le fructose et le mannose. Le saccharide est de préférence un disaccharide. Le disaccharide est de préférence un dimère de glucose. Plus préférentiellement, le disaccharide est choisi parmi le tréhalose et le saccharose.

Les trisaccharides sont de préférence choisis parmi le raffinose (trimère de galactose, glucose et fructose), le maltotriose et l'isomaltotriose (trimères de glucose).

Le saccharide est de préférence présent dans la composition selon l'invention en concentration comprise entre 10 et 20 mmol/L, de préférence entre 10 et 15 mmol/L, de préférence entre 12,5 et 15 mmol/L.

La composition selon l'invention comprend au moins une vitamine (composé b)).
Le(s) vitamine(s) est (sont) notamment choisie(s) parmi les vitamines B1 (thiamine), B2 (riboflavine), B4 (choline), B5 (acide panthoténique), B6 (pyridoxal), B7 (inositol), B9 (acide folique), PP (nicotinamide) et leurs mélanges.

De préférence, la composition selon l'invention comprend un mélange de vitamines B1, B2, B4, B5, B6, B7, B9 et PP. Un tel mélange de vitamines est notamment commercialisé par Thermo Fisher sous la référence Gibco® MEM Vitamin Solution (100X).
La (ou les) vitamine(s) est(sont) de préférence présente(s) dans la composition selon l'invention en concentration comprise entre 0,1 et 100 mg/L, de préférence entre 0,5 et 90 mg/L, de préférence entre 1 et 80 mg/L, de préférence entre 1,5 et 70 mg/L, de préférence entre 2 et 60 mg/L, de préférence entre 2,5 et 50 mg/L, de préférence entre 3 et 40 mg/L, de préférence entre 3,5 et 30 mg/L, de préférence entre 4 et 20 mg/L, de préférence entre 4,5 et 20 mg/L, de préférence entre 5 et 10 mg/L.

La composition selon l'invention comprend au moins un acide aminé (composé c)). De préférence, le (les) acide(s) aminé(s) est (sont) choisi(s) parmi la glutamine, l'alanyl-glutamine, le tryptophane, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, la valine, la leucine et l'isoleucine, l'arginine, l'histidine, la tyrosine, la cystéine et leurs mélanges.
De préférence, la composition selon l'invention comprend au moins un mélange de glutamine et d'alanyl-glutamine, en particulier un mélange de L-glutamine et de L-alanyl-L-glutamine.

De préférence, la composition selon l'invention comprend des acides aminés essentiels.
Un acide aminé essentiel est un acide aminé qui ne peut être synthétisé *de novo* par l'organisme (généralement humain) ou qui est synthétisé à une vitesse insuffisante, et doit donc être apporté par l'alimentation, condition nécessaire au bon fonctionnement de l'organisme.
Chez l'homme, on compte huit acides aminés essentiels : le tryptophane, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, la valine, la leucine et l'isoleucine.
La composition selon l'invention comprend de préférence les huit acides aminés essentiels précités, ainsi que de l'arginine, de l'histidine, de la tyrosine et de la cystéine.
Un tel mélange d'acides aminés est notamment commercialisé par Thermo Fisher sous la référence Gibco® MEM Amino Acids 50X.

Les acides aminés sont de préférence présents dans la composition selon l'invention en concentration comprise entre 10 et 700 mg/L, de préférence entre 50 et 700 mg/l, de préférence entre 100 et 700 mg/L, de préférence entre 150 et 700 mg/L, de préférence entre 200 et 700 mg/L, de préférence entre 250 et 700 mg/L, de préférence entre 300 et 700 mg/L, de préférence entre 300 et 600 mg/L.

La composition selon l'invention comprend de préférence un mélange des huit acides aminés essentiels précités, de l'arginine, de l'histidine, de la tyrosine, de la cystéine, de la glutamine et de l'alanyl-glutamine.
De préférence la composition selon l'invention comporte de la cystéine.

La composition selon l'invention comprend au moins un antioxydant (composé d)). Par « antioxydant », il est entendu tout composé permettant de ralentir ou empêcher l'oxydation provoquée par un agent oxydant pouvant entrainer la production de radicaux libres. Dans la composition de la présente invention, l'antioxydant permet de protéger les cellules du stress oxydatif et donc de maintenir ou améliorer leur viabilité.

De préférence, la composition selon l'invention comprend au moins un antioxydant choisi parmi le glutathion, la vitamine C, la vitamine E, la vitamine A, la L-cystéine ou le coenzyme Q10.

De préférence, la composition selon l'invention comprend du glutathion.

De préférence, le(s) antioxydant(s) est (sont) présent dans la composition selon l'invention en concentration comprise entre 0,5 et 2 g/L, de préférence entre 0,5 et 1,5 g/L, de préférence entre 0,8 et 1 g/L.

De préférence, la composition selon l'invention comprend en outre un lysat plaquettaire.
Le lysat plaquettaire est de préférence présent dans la composition selon l'invention en concentration comprise entre 5% et 30% en volume, de préférence entre 15% et 25% en volume par rapport au volume total de composition.

De préférence, le lysat plaquettaire comprend au moins un facteur de croissance choisi parmi TGF-beta1, EGF, PDGF-AB, IGF-1, VEGF, bFGF et leurs mélanges.

De préférence, la composition selon l'invention est substantiellement exempte de dextran. Par composition « substantiellement exempte », on entend que cette composition contient moins de 10% en poids, de préférence moins de 5% en poids, de préférence moins de 3% en poids, de préférence moins de 1% en poids de dextran. De préférence, la composition selon l'invention ne contient pas de dextran.

De préférence, la composition selon l'invention comprend, dans un milieu aqueux comprenant des électrolytes:

a) du glucose,

b) un mélange de vitamines B1, B2, B4, B5, B6, B7, B9 et PP,

c) un mélange de glutamine, alanyl-glutamine, tryptophane, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, valine, leucine, isoleucine, arginine, histidine, tyrosine et de cystéine, et

d) du glutathion.

La composition selon l'invention est particulièrement intéressante, et vise à conserver au moins un échantillon de cellules à visée thérapeutique. En effet, les composés a) à d) utilisés dans la composition permettent de conserver les cellules à visée thérapeutique, de façon durable et efficace.

Par « conservation » ou « préservation », il est entendu que la viabilité cellulaire après 24 heures d'incubation dans la composition de l'invention à une température comprise entre +1°C et +5°C inclus, de préférence à une température de +4°C, est comprise entre 85% et 100%, la viabilité cellulaire après 48 heures d'incubation dans la composition de l'invention à une température comprise entre +1°C et +5°C inclus, de préférence à une température de +4°C, est comprise entre 80% et 100%, la viabilité cellulaire après 72 heures d'incubation dans la composition de l'invention à une température comprise entre +1°C et +5°C inclus, de préférence à une température de +4°C, est comprise entre 70% et 100%.

Dans un mode de réalisation de l'invention, la viabilité cellulaire est mesurée directement sur les cellules dans la composition de l'invention par cytométrie en flux après marquage des cellules au Iodure de Propidium (IP) qui est un marqueur de viabilité cellulaire. Dans un second mode de réalisation, la viabilité cellulaire est mesurée directement sur les cellules dans la composition de l'invention par comptage sur cellules de Malassez après marquage des cellules au bleu de trypan. Dans un troisième mode de réalisation, la viabilité cellulaire est mesurée directement sur les cellules dans la composition de

l'invention par comptage avec un automate de comptage tel que Nucleocounter après marquage avec de l'Acridine Orange (marqueur cellulaire) et du DAPI (marqueur de mortalité cellulaire).

Par « cellules à visée thérapeutique », on entend des cellules qui constituent en elles-mêmes le produit thérapeutique, et qui sont administrées au patient. Ces cellules sont distinctes des cellules qui sont cultivées pour la production de médicaments biologiques, comme par exemple les cellules CHO, HEK ou encore YB2/0, et qui ne sont pas destinées à être administrées au patient.

Parmi les cellules à visée thérapeutique, on peut citer notamment les médicaments de thérapie innovante ou les produits de thérapie cellulaire.

Les cellules à visée thérapeutique (composés d)) sont de préférence choisies parmi :

- les cellules immunitaires, telles que les cellules NK, les monocytes, les lymphocytes B, les lymphocytes T, naturels ou génétiquement modifiés, tels que les lymphocytes T régulateurs, les lymphocytes T infiltrant les tumeurs, les lymphocytes T cytotoxiques, les lymphocytes T auxiliaires (ou helper) et les lymphocytes T ayant un récepteur antigénique chimérique (CAR) ;
- les myoblastes notamment humains ;
- les cellules souches hématopoïétiques ;
- les cellules souches mésenchymateuses ;
- les cellules cardiaques ;
- les fibroblastes ; et
- toutes autres cellules naturelles ou génétiquement modifiées.

Les cellules NK (ou lymphocytes NK) sont des cellules de l'immunité innée. Ce sont des lymphocytes non T (CD3-), non B (CD19-), caractérisés chez l'homme par les marqueurs CD56, CD16 et NK.

Les monocytes sont des leucocytes qui évoluent en macrophages, cellules dendritiques ou ostéoclastes.

Les lymphocytes B sont les cellules immunitaires responsables de la production d'anticorps.

Les lymphocytes T régulateurs sont une sous-population de lymphocytes T CD4+, qui inhibent la prolifération d'autres lymphocytes T effecteurs.

Les lymphocytes T cytotoxiques sont une sous-population de lymphocytes T CD8+, qui détruisent les cellules infectées.

Les lymphocytes T auxiliaires (helper) sont une sous-population de lymphocytes T CD4+, intermédiaires de la réponse immunitaire.

Enfin, les lymphocytes T ayant un récepteur antigénique chimérique (CAR), appelés également cellules CAR-T, correspondent à une technologie particulière d'ingénierie cellulaire. Ce sont des lymphocytes T qui expriment un récepteur antigénique chimérique. Les cellules CAR-T sont capables de tuer les cellules cancéreuses, par reconnaissance et liaison à l'antigène tumoral présent sur lesdites cellules cancéreuses.

L'échantillon de cellules à visée thérapeutique peut provenir du patient à traiter (dans ce cas le patient et le donneur sont la même personne), par biopsie ou prélèvement sanguin. Dans ce cas, la composition obtenue et conservée sera administrée à ce même patient : c'est un produit autologue.

Alternativement, l'échantillon de cellules à visée thérapeutique peut provenir d'une autre source (i.e. autre individu, ingénierie cellulaire), notamment par biopsie ou prélèvement sanguin. Dans ce cas, la composition obtenue et conservée sera administrée à un patient à traiter autre que le donneur : c'est un produit allogénique.

De préférence, la composition selon l'invention comprend une concentration de cellules comprise entre 2 et 300 M cellules / mL, de préférence entre 10 et 200 M cellules / mL, de préférence entre 20 et 100 M cellules / mL.

La présente invention se rapporte également à un procédé de conservation d'un échantillon de cellules à visée thérapeutique, comprenant au moins une étape de mélange de l'échantillon de cellules à visée thérapeutique avec:

a) au moins un saccharide,

b) au moins une vitamine,

c) au moins un acide aminé,

d) au moins un antioxydant,

un milieu physiologiquement acceptable,

la composition ainsi obtenue ayant un pH compris entre 7.0 et 8.5., de préférence compris entre 7.0 et 8.3.

Dans ce procédé, l'étape de mélange de l'échantillon de cellules à visée thérapeutique avec les différents composés décrits ci-dessus se fait typiquement par dilution. Le mélange peut se faire à une température comprise entre +1°C et +20°C inclus, de

préférence entre +2°C et +20°C inclus, de préférence entre +2°C et +15°C inclus, de préférence entre +2°C et +10°C inclus, de préférence entre +2°C et +6°C inclus, de préférence à 4°C.

De préférence, l'échantillon de cellules à visée thérapeutique est, quant à lui, préalablement cultivé *in vitro*, dans un milieu de culture approprié. Puis il subit une centrifugation, le surnageant est retiré et le culot est suspendu dans un mélange de milieu physiologiquement acceptable et de composés a) à d) décrits ci-dessus, afin d'obtenir une composition ayant un pH compris entre 7.0 et 8.5, de préférence compris entre 7.0 et 8.3.

L'échantillon peut ensuite être conservé à une température comprise entre +1°C et +20°C inclus, de préférence entre +2°C et +20°C inclus, de préférence entre +2°C et +15°C inclus, de préférence entre +2°C et +10°C inclus, de préférence entre +2 et +6°C inclus, de préférence à +4°C.

L'invention est illustrée par les exemples suivants, nullement limitatifs.

Exemples :

Exemple 1 : Préparation de formulations selon l'invention

Les formulations suivantes ont été préparées et testées pour leur capacité à préserver les myoblastes (solutions 1, 3, 4, 6, 7, 8) ou les cellules souches mésenchymateuses (MSC) (A, Abis, B, C).

Les myoblastes peuvent être préparés comme décrit dans la demande FR2810045.

Les cellules souches mésenchymateuses peuvent être préparées comme décrit dans Sensebé L, Bourin P, Tarte K. *Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells.* Hum Gene Ther. 2011 Jan; 22 (1): 19-26.

Solutions préparées (pour un volume final de 5 mL) pour la conservation des myoblastes

	Référence	1	3	4	5	6	7	8
Solution d'ions 5X glutathion*			1000µL					
Solution d'ions 5X*	1000µL	1000µL		1000µL				
Solution d'ions 5X 50% eau*					1000µL			
Solution d'ions 5X 50% eau + glutathion*						1000µL		1000µL
Solution d'ions 5X Ringer solution + glutathion*							1000µL	
Eau		1000µL	1000µL	1525µL	1525µL	1525µL	1000µL	1525µL
Plasmalyte*	2675 µL	1675 µL	425 µL					
Ringer solution							425µL	
Bicarbonate 1,4 (333 mOsm/L)	1325µL	1325µL	1325µL	1325µL	1325µL	1325µL	1325µL	1325µL
Vitamines (Gibco MEM Vitamin solution 100X)			50µL	50µL	50µL	50µL	50µL	50µL
Acides aminés (Gibco MEM Amino Acid 50X)			100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL
Lysat plaquettaire***			1000µL	1000µL	1000µL	1000µL	1000µL	1000µL
Dextran 5%				250mg	250mg	250mg		250mg
Glutamax** (100X) liquide			100µL			100µL	100µL	100µL
Total	5000 µL	5000 µL	5000 µL	5000 µL	5000 µL	5000 µL	5000 µL	5000 µL
pH à 1h, (+3 ±2°C)	7.67	7.49	7.33	7.41	7.52	7.38	79	7.81

Solutions préparées (volume final de 10 mL) pour la conservation des cellules souches mésenchymateuses (MSC)

	sol A	sol A bis	sol B	sol C
Solution d'ions 5X Ringer solution + glutathion*	2000µL	2000µL	2000µL	2000µL
eau	2000µL	2000µL	3000µL	2600µL
Ringer solution *	850µL	850µL	1850µL	1450µL
Bicarbonate liquide 1,4% (333 mOsm/L)	2650µL	2650µL	2650µL	2650µL
Vitamines (MEM Vitamin solution 100X de Gibco)	100µL	100µL	100µL	100µL
Acides aminés MEM Amino Acid 50X de Gibco)	200µL	200µL	200µL	200µL
Lysat plaquettaire***	2000µL			800µL
Lysat plaquettaire irradié ***		2000µL		
Glutamax (100X) liquide)**	200µL	200µL	200µL	200µL
Total	10000µL	10000µL	10000µL	10000µL
pH à 1h, (+3 ±2°C)	8.07	7.93	7.73	7.78

* Cf ci-dessous

** Mélange 200mM L-alanyl-L-glutamine

*** Composition en lysat plaquettaire

L'ingrédient « Solution d'ions 5X » correspond à :

	Solution d'ions 5X (pour 20mL de solution)
Plasmalyte (voir ci-dessous)	20 mL
Magnésium	32,5 mg
Glucose	270,3 mg
Sodium acétate	172,3 mg
Trisodium citrate	276,5 mg
Acide citrique	92,2 mg

L'ingrédient « Solution d'ions 5X glutathion » correspond à :

	Solution d'ions 5X glutathion (pour 20mL de solution)
Plasmalyte (voir ci-dessous)	20 mL
Magnésium	32,5 mg
Glucose	270,3 mg
Sodium acétate	172,3mg
Trisodium citrate	276,5 mg
Acide citrique	92,2 mg
Glutathion réduit	33,8 mg

L'ingrédient « Solution d'ions 5X 50% eau » correspond à :

	Solution d'ions 5X 50% eau (pour 20mL de solution)
Eau pour préparation injectable (eau PPI)	10 mL
Plasmalyte (voir ci-dessous)	10 mL
Magnésium	32,5 mg
Glucose	270,3 mg
Sodium acétate	172,3 mg
Trisodium citrate	276,5 mg
Acide citrique	92,2 mg

L'ingrédient « Solution d'ions 5X 50% eau + glutathion » correspond à :

	Solution d'ions 5X 50% eau + glutathion (pour 20mL de solution)
Eau pour préparation injectable (eau PPI)	10 mL
Plasmalyte (voir ci-dessous)	10 mL
Magnésium	32,5 mg
Glucose	270,3 mg
Sodium acétate	172,3mg
Trisodium citrate	276,5 mg
Acide citrique	92,2 mg
Glutathion réduit	33,8 mg

L'ingrédient « Solution d'ions 5X Ringer solution + glutathion » correspond à :

	Solution d'ions 5X Ringer solution +glutathion (pour 20mL de solution)
Ringer solution (voir ci-dessous)	20 mL
Magnésium	32,5 mg
Glucose	270,3 mg
Sodium acétate	172,3mg
Trisodium citrate	276,5 mg
Acide citrique	92,2 mg
Glutathion réduit	33,8 mg

5

L'ingrédient « Plasmalyte » correspond à :

	Plasmalyte (pour 1000 mL de solution)
NaCl	5,26 g
KCl	0,37 g
MgCl2	0,30 g
Acétate de sodium trihydrate (C2H3NaO2)	3,68 g
Gluconate de sodium	5,02 g
Eau pour préparation injectable (eau PPI)	Qsp 1000 mL

L'ingrédient « Ringer Solution » correspond à :

	Ringer solution (pour 1000 mL de solution)
NaCl	8.60 g
KCl	0.30 g
Chlorure de calcium dihydrate	0.33 g
Eau pour préparation injectable (eau PPI)	Qsp 1000 mL

***Composition en facteurs de croissance du lysat plaquettaire :

Facteur de croissance	concentration en pg/mL	Ecart-type relatif (%)
PDGF-AB	60000	8,39
IGF-1	49000	3,88
EGF	3500	4,79
VEGF	910	4,22
bFGF	150	6,33

Exemple 2 : Préservation des myoblastes dans les formulations de l'invention

Protocole expérimental :

La viabilité des myoblastes a été mesurée selon le protocole ci-dessous :

La mesure de la viabilité par cytométrie en flux est effectuée après marquage des cellules au Iodure de Propidium (IP) qui est un marqueur de viabilité cellulaire. Il permet de déterminer la viabilité des cellules.

La mesure du pourcentage de myoblastes est réalisée par cytométrie en flux. Elle correspond au pourcentage de cellules vivantes IP-, CD56+, CD15- après marquage des cellules à l'aide d'anticorps spécifiques CD56, CD15 et de IP. En effet, le produit testé contient également des impuretés qui sont des cellules CD56- et CD15+ ou – et qui peuvent prendre le pas sur les myoblastes car moins exigeants en terme de culture. Le but est de maintenir le pourcentage de myoblastes dans le produit après congélation et donc de se rapprocher de la valeur avant congélation.

La viabilité cellulaire et la mesure du pourcentage de myoblastes ont été analysées directement avant formulation (T0h) puis 24, 48, 72 ou 144 heures après formulation et incubation à +3 ±2°C.

Résultats :

1ère série d'essais

	Référence	Solution 1	Solution 3	Solution 4	Solution 5	Solution 6
Viabilité T0h	99%					
Viabilité T24h	77.9%	84.1%	97.1%	92.5%	92,5%	92.6%
Viabilité T48h	48.2%	55.0%	92.6%	64.5%	63.8%	65.2%
Viabilité T72h	9.7%	19.0%	84.6%	25.4%	26.9%	29.0%

2ème série d'essais

	Solution 3	Solution 3 (réalisée en duplicat)	Solution 7	Solution 8
Viabilité T0h	99.4			
Viabilité T24h	94.2%	92.9%	93.9%	91.3%
Viabilité T48h	82.4%	82.9%	82.8%	65.7%
Viabilité T72h	73.0%	73.8%	74.8%	31.6%
% myoblastes T72h	46.1%	45.4%	44.7%	
Viabilité T144h	64.0%	64.2%	68.1%	
% myoblastes T144h	52.6%	55.6%	53.3%	

3ème série d'essais

	Solution 3	Solution 7
Viabilité T24h	87.4%	88.8%
Viabilité T48h	83.5%	87.6%
Viabilité T72h	70.6%	81.4%

Il ressort que :

- que les formulations préparées ont un pH physiologique compris entre 7 et 8,5 ;
- que les formulations ont une osmolarité comprise entre 300 et 400 mOsm/L, se rapprochant de l'osmolarité physiologique ;
- les formulations 3 et 7 utilisées pour l'essai 3, préparées 6 jours auparavant et conservées à +3 ±2°C, sont stables et préservent les cellules ;
- l'ajout de dextran 5% provoque un stress pour les cellules et semble impliqué dans une diminution de leur viabilité cellulaire (formulations 4 à 6) ;
- les formulations contenant du glutathion préservent mieux les cellules à +3 ±2°C . Les viabilités des cellules obtenues après conservation pendant 72h dans les formulations comportant du glutathion sont supérieures à 70% (cf formulations 3 et 7) ;
- l'utilisation du Plasmalyte ou de Ringer solution ne modifie pas la solution (cf formulations 3 et 7) ;
- la formulation la plus efficace semble être la formulation 3 ou 7 (formulation Plasmalyte ou Ringer solution, sans dextran et avec du glutathion). Elles permettent la conservation de plus de 85% des cellules après 24heures de conservation à +3 ±2°C, de plus de 80% des cellules après 48 heures de conservation à +3 ±2°C et de plus de 70% des cellules après 72 heures de conservation à +3 ±2°C.

Exemple 3 : Préservation des cellules souches mésenchymateuses dans les formulations de l'invention

a) Test de viabilité cellulaire

Protocole expérimental

Pour déterminer la viabilité des MSC dans les solutions testées, les cellules ont été d'abord concentrées à 2000 cellules/µL puis diluées au ½ avec du bleu trypan (marqueur de mortalité cellulaire). Un volume de 1mm^3 de cellules diluées dans la solution de bleu Trypan est déposé sur une cellule de Malassez et les cellules sont comptées au microscope (objectif 40). Les cellules mortes sont marquées au bleu trypan alors que les cellules vivantes sont capables de le relarguer et ne sont donc pas colorées.

Le calcul de concentration cellulaire et de viabilité cellulaire se fait selon le calcul suivant :

$$Concentration = \frac{Nb\ cellules\ comptées\ x100\ x1000\ x\ facteur\ dilution}{Nb\ carreaux\ comptés}\ (cellules/mL)$$

$$\%\ de\ viabilité\ = \frac{Vivantes}{vivantes + mortes}$$

Lorsque les cellules sont formulées dans les solutions A, Abis, B et C, elles sont conservées pendant 72h à +3 ±2°C, puis la viabilitécellulaire est mesurée.

Le « DP AH4% » correspond à la solution de référence dans laquelle les cellules sont formulées uniquement dans de l'albumine humaine 4% et conservées pendant 24 heures à +3 ±2°C.

La *Drug Substance* « DS » correspond aux cellules issues de la récolte en fin de procédé avant formulation.

Résultats :

Lot MSC	**Formulation**	**Temps**	**% de viabilité au bleu de Trypan**
MSC 1	DS	T0h	94
	DP AH4%	T24h	60,6
	Sol A	T72h	83,8
	Sol B	T72h	86,5
MSC 2	DS	T0h	93,5
	DP AH4%	T24h	71,7
	Sol A	T72h	84,9
	Sol B	T72h	77,9
	Sol C	T72h	71,8
MSC 3	DS	T0h	100
	DP AH4%	T24h	65,2
	Sol A	T72h	75,8
	Sol A bis	T72h	79,5
	Sol B	T72h	78,1

Il ressort que les solutions A, Abis, B et C permettent une bonne conservation des cellules formulées dans ces solutions après 72 heures de conservation à +3 ±2°C (plus de 70% de viabilité cellulaire pour chacune de ces solutions).

b) Phénotype

Protocole expérimental :

Une analyse du phénotype des cellules est effectuée afin de déterminer la stabilité des MSC en formulation dans les solutions A, Abis, B et C. Le phénotype est analysé par cytométrie en flux et correspond au pourcentage de cellules CD90+/CD73+/CD45- /CD34- à l'aide d'anticorps spécifiques CD90, CD73, CD45 et CD34 marqués au Phycoerythrin (PE).

Lorsque les cellules sont formulées dans les solutions A, Abis, B et C, elles sont conservées pendant 72h à +3 ±2°C. A 72 heures, le phénotype des cellules est observé.

La *Drug Substance* « DS » correspond aux cellules issues de la récolte en fin de procédé avant formulation.

Résultats :

Lot MSC	**Formulation**	**Temps**	**Marqueur**			
			CD90	**CD73**	**CD45**	**CD34**
			Spec ≥ 95%	**Spec ≥ 95%**	**Spec ≤5%**	**Spec ≤ 2%**
MSC 1	DS	T0h	99,8	99,7	0,1	0,1
	Sol A	T72h	99,8	99,2	0,4	0,2
	Sol B	T72h	99,6	99,4	0,5	0,3
MSC 2	DS	T0h	99	99,5	0,5	0,3
	Sol A	T72h	95,9	97,7	0,1	0
	Sol B	T72h	99,2	92,6	0,2	0
	Sol C	T72h	97,7	97,4	0,2	0
MSC 3	DS	T0h	99,3	99,1	0,3	0,3
	Sol A	T72h	99,9	99,7	0,4	0,2
	Sol A bis	T72h	99,8	97,2	0,2	0,1
	Sol B	T72h	99,8	96,1	0,8	0,8

Le phénotype des MSC formulées dans les solutions A, Abis, B et C est bien conservé après 72 heures de conservation à +3 ±2°C (plus de 95% des marqueurs CD90 et CD73, moins de 2% des marqueurs CD45 et CD34).

c) **Test d'apoptose**

Protocole expérimental :

Le test d'apoptose permet de déterminer la mortalité précoce des cellules par apoptose.

Le principe du test d'apoptose repose sur un double marquage SYTOX green (marqueur d'intégrité membranaire – marqueur des cellules mortes), Annexine V (marqueur d'apoptose précoce) analysé par cytométrie en flux. Ce marquage permet de distinguer les cellules en apoptose précoce (SYTOX-/AnnexinV+), des cellules mortes (SYTOX+/AnnexinV+) et vivantes (SYTOX-/AnnexinV-).

Lorsque les cellules sont formulées dans les solutions A, Abis, B et C, elles sont conservées pendant 72h à +3 ±2°C. A 72 heures, le test d'apoptose est ensuite réalisé.

Le « DP AH4% » correspond à la solution de référence dans laquelle les cellules sont formulées uniquement dans de l'albumine humaine 4% et conservées pendant 24 heures à +3 ±2°C.

La *Drug Substance* « DS » correspond aux cellules issues de la récolte en fin de procédé avant formulation.

Résultats

Numéro de lot	**Formulation**	**Temps**	**% cellules non apoptotique**	**% d'écart p/r au DP AH 4%**
MSC 1	DS	T0	95,5	
	DP AH4%	T24h	0,2	
	Sol A	T72h	85,8	+428 %
	Sol B	T72h	69,2	+345 %

MSC 2	DS	T0	85,9	
	DP AH4%	T24h	51,9	
	Sol A	T72h	84,9	+12,7 %
	Sol B	T72h	77,9	+17,7 %
	Sol C	T72h	71,8	+3,5 %
MSC 3	DS	T0	89,1	
	DP AH4%	T24h	19,8	
	Sol A	T72h	57,6	+191 %
	Sol A bis	T72h	58,9	+197 %
	Sol B	T72h	39,3	+98 %

Le pourcentage de cellules non apoptotiques après 72 heures de conservation à +3 ±2°C pour les formulations préparées avec solutions A, Abis, B et C est supérieur au pourcentage de cellules non apoptotiques des cellules formulées dans la solution de référence (DP AH4%) après 24 heures à +3 ±2°C.

Il ressort de ces analyses que :

- les formulations préparées A, Abis, B et C sont stables et préservent bien le phénotype des MSC pendant 72 heures à +3 ±2°C;
- les formulations préparées A, Abis, B et C permettent une bonne conservation des cellules (plus de 70% de cellules viables après 72 heures de conservation à +3 ±2°C).

REVENDICATIONS

1. Composition comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable :

a) au moins un saccharide,

b) au moins une vitamine,

c) au moins un acide aminé,

d) au moins un antioxydant, et

e) des cellules à visée thérapeutique,

ladite composition ayant un pH compris entre 7.0 et 8.5.

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle présente un pH compris entre 7.0 et 8.3

3. Composition selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle comporte un lysat plaquettaire.

4. Composition selon les revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le saccharide est choisi parmi les monosaccharides, les disaccharides et les trisaccharides.

5. Composition selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la vitamine est choisie parmi les vitamines B1, B2, B4, B5, B6, B7, B9, PP et leurs mélanges.

6. Composition selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce l'acide aminé est choisi parmi la glutamine, l'alanyl-glutamine, le tryptophane, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, la valine, la leucine et l'isoleucine, l'arginine, l'histidine, la tyrosine, la cystéine et leurs mélanges.

7. Composition selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'acide aminé est la cystéine.

8. Composition selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que l'antioxydant est choisi parmi le glutathion, la vitamine C, la vitamine E, la vitamine A, la L-cystéine ou le coenzyme Q10.

9. Composition selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que l'antioxydant est le glutathion.

10. Composition selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un sel de bicarbonate.

11. Composition selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que les cellules à visée thérapeutique sont choisies parmi les cellules NK, les monocytes, les lymphocytes B, les lymphocytes T naturels ou génétiquement modifiés, tels que les lymphocytes T régulateurs, les lymphocytes T infiltrant la tumeur, les lymphocytes T cytotoxiques, les lymphocytes T auxiliaires (ou helper) et les lymphocytes T ayant un récepteur antigénique chimérique (CAR), les myoblastes notamment humains, les cellules souches hématopoïétiques, les cellules souches mésenchymateuses, les cellules cardiaques et les fibroblastes.

12. Composition selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que le milieu physiologiquement acceptable est un milieu aqueux comprenant des électrolytes, et en ce que la composition comprend:

a) du glucose,

b) un mélange de vitamines B1, B2, B4, B5, B6, B7, B9 et PP,

c) un mélange de glutamine, alanyl-glutamine, tryptophane, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, valine, leucine, isoleucine, arginine, histidine, tyrosine et de cystéine,

d) du glutathion, et

d) des cellules à visée thérapeutique.

13. Procédé de conservation d'un échantillon de cellules à visée thérapeutique, comprenant au moins une étape de mélange de l'échantillon de cellules à visée thérapeutique avec:

a) au moins un saccharide,

b) au moins une vitamine,

c) au moins un acide aminé,

d) au moins un antioxydant, et

un milieu physiologiquement acceptable,

la composition ainsi obtenue ayant un pH compris entre 7.0 et 8.5.

14. Procédé de conservation selon la revendication 13, caractérisé en ce que le pH est compris entre 7.0 et 8.3.

15. Utilisation d'une composition comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable :

a) au moins un saccharide,

b) au moins une vitamine,

c) au moins un acide aminé,

d) du glutathion,

et ayant un pH compris entre 7.0 et 8.5, pour la conservation d'au moins un échantillon de cellules à visée thérapeutique.

16. Utilisation d'une composition selon la revendication 15, ladite composition ayant un pH compris entre 7.0 et 8.3.

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement national

FA 860624
FR 1860544

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	WO 00/19817 A1 (CEDARS SINAI MEDICAL CENTER [US]) 13 avril 2000 (2000-04-13) * revendications 1-25 * -----	1-16	A61K31/7004 A61K31/70 A61K31/095
A	WO 95/29230 A1 (DIACRIN INC [US]; GEN HOSPITAL CORP [US]) 2 novembre 1995 (1995-11-02) * revendications 1-49 * -----	1-16	
A	WO 2017/042501 A1 (ETABLISSEMENT FRANCAIS DU SANG [FR]) 16 mars 2017 (2017-03-16) * revendications 1-12 * -----	1-16	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
			A61K

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
9 juillet 2019	Schneider, Aurore

CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS

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

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

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1860544 FA 860624

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 09-07-2019
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
WO 0019817 A1	13-04-2000	EP 1119244 A1	01-08-2001
		US 6485959 B1	26-11-2002
		WO 0019817 A1	13-04-2000
WO 9529230 A1	02-11-1995	AU 2387795 A	16-11-1995
		US 5543316 A	06-08-1996
		WO 9529230 A1	02-11-1995
WO 2017042501 A1	16-03-2017	CA 2986267 A1	16-03-2017
		CN 108135154 A	08-06-2018
		EP 3346833 A1	18-07-2018
		FR 3040860 A1	17-03-2017
		RU 2017142903 A	10-06-2019
		US 2018184643 A1	05-07-2018
		WO 2017042501 A1	16-03-2017

EPO FORM P0465