

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle

Bureau international



(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2011/001402 A2**

(43) Date de la publication internationale  
6 janvier 2011 (06.01.2011)

PCT

(51) Classification internationale des brevets :  
A61L 2/00 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/IB2010/053017

(22) Date de dépôt international :  
1 juillet 2010 (01.07.2010)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
0903292 3 juillet 2009 (03.07.2009) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :  
UNIVERSITE BORDEAUX 1 [FR/FR]; 351 cours de la Libération, F-33405 Talence Cedex (FR). UNIVERSITE VICTOR SEGALEN - BORDEAUX 2 [FR/FR]; 146 rue Léo Saignat, F-33076 Bordeaux Cedex (FR). ETABLISSEMENT FRANCAIS DU SANG [FR/FR]; 20 avenue du Stade de France, F-93218 La Plaine Saint-Denis Cedex (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :  
DEMAZEAU, Gérard [FR/FR]; 42 rue de Chouiney, F-33170 Gradignan (FR). RIVALAIN, Nolwennig [FR/FR]; Résidence Compostelle, Appt K11D1, Rue du Relais, F-33600 Pessac (FR). LARGETEAU, Alain [FR/FR]; 13 avenue Saint-Hubert, F-33610 Cestas (FR). ROQUAIN, Jean [FR/FR]; Le Cos Marianne, 41 rue du Pont du Gail, F-33520 Bruges (FR). BOIRON, Jean-

Michel [FR/FR]; 20 rue du Lavoir, F-33000 Bordeaux (FR). MAUREL, Jean-Paul [FR/FR]; 60bis avenue de Magonty, F-33600 Pessac (FR). IVANOVIC, Zoran [FR/FR]; 1 rue de la Paix, Résidence Parc d'Aquitaine, Appartement 123, F-33700 Merignac (FR).

(74) Mandataire : NOVAGRAAF TECHNOLOGIES; 122 rue Edouard Vaillant, F-92593 Levallois-Perret Cedex (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : METHOD FOR INACTIVATING AT LEAST ONE PATHOGEN IN HUMAN BLOOD PLASMA SAMPLE

(54) Titre : PROCEDE D'INACTIVATION D'AU MOINS UN AGENT PATHOGENE DANS UN ECHANTILLON DE PLASMA SANGUIN HUMAIN

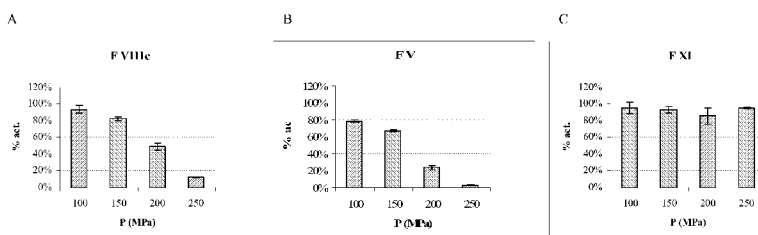


Figure 1

(57) Abstract : The present invention relates to a method for inactivating at least one pathogen of a human blood plasma sample, including: adiabatically compressing said sample, the temperature of said plasma being, at a pressure  $P_1$ , between  $-10^{\circ}\text{C}$  and  $-3^{\circ}\text{C}$  as a result of the compression; optionally maintaining the pressure  $P_1$  for a time of 110 to 130 seconds; and adiabatically expanding the sample. The present invention also relates to the use of the method of the invention and to the plasma obtained by the method of the invention. The method and the materials obtained by said method are particularly useful in the therapeutic and non-therapeutic fields.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à un procédé d'inactivation d'au moins un agent pathogène d'un échantillon de plasma sanguin humain comprenant la compression adiabatique dudit échantillon, la température dudit plasma à la pression  $P_1$  étant comprise entre  $-10^{\circ}\text{C}$  et  $-3^{\circ}\text{C}$  du fait de la compression, le maintien éventuel de la pression  $P_1$  durant un temps compris entre 110 et 130 secondes, et la détente adiabatique de l'échantillon. La présente invention se rapporte également à l'utilisation du procédé de l'invention et au plasma obtenu par le procédé de l'invention. Le procédé et les produits obtenus par ce procédé trouvent notamment des applications dans les domaines thérapeutiques et non thérapeutiques.



WO 2011/001402 A2

**Publiée :**

- *sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport (règle 48.2.g)*

## PROCEDE D'INACTIVATION D'AU MOINS UN AGENT PATHOGENE DANS UN ECHANTILLON DE PLASMA SANGUIN HUMAIN

### DESCRIPTION

5

#### Domaine technique

[001] La présente invention se rapporte à un procédé d'inactivation d'au moins un agent pathogène d'un échantillon de plasma sanguin humain, à un plasma obtenu par ce procédé et à un dispositif pour la mise en œuvre du procédé.

10

[002] Le plasma sanguin humain obtenu est un plasma biologiquement actif dans lequel au moins un agent pathogène est inactivé.

15

[003] Le procédé et les produits obtenus par ce procédé trouvent notamment des applications dans les domaines thérapeutiques et non thérapeutiques.

[004] Dans la description ci-dessous, les références entre parenthèses (Réf) renvoient à la liste des références présentées à la fin du texte.

20

#### Etat de la technique

[005] La sécurisation du plasma sanguin humain, qui peut être considérée comme l'inactivation des agents pathogènes et la sauvegarde de ses propriétés thérapeutiques, est actuellement assurée par des procédés chimiques. Il s'agit de procédés comprenant l'ajout dans le plasma de substances chimiques susceptibles de le décontaminer, par exemple des solvants et détergents etc., des procédés associant substances chimiques et procédés physico-chimiques, par exemple des molécules photosensibles associées à une illumination par une radiation lumineuse de longueur d'onde donnée (UV par exemple), ou des procédés thermiques, par exemple la pasteurisation à 60°C après ajout de

25  
30

stabilisateurs de protéines, la filtration, l'irradiation gamma...(Ref.1) C. Naegelen et al. [Evolution des techniques de préparation des produits sanguins labiles (PSL) : inactivation des pathogènes dans les PSL], Transfusion Clinique et Biologique 16 (2006) pp.179-189.

5 [006] Ces procédés sont contraignants du fait que tout ajout d'une substance étrangère dans le plasma sanguin humain implique à l'issue du procédé une étape d'élimination et/ou de purification du plasma ou qu'ils affectent les propriétés du plasma. Cette étape finale ne permet pas d'obtenir un plasma sanguin « identique ». En effet, l'élimination des  
10 substances chimiques n'est jamais totale et peut entraîner une toxicité à long terme, par exemple par accumulation. Par ailleurs, le traitement du plasma à des températures élevées, c'est-à-dire supérieure ou égale à 60°C dénature les protéines présentes et donc de ce fait oblige à ajouter encore des produits chimiques pour stabiliser ces protéines.

15 [007] Des procédés de traitements sous hautes pressions sont connus dans le domaine agro-alimentaire pour inactiver certains agents pathogènes tels que des moisissures, des bactéries et parfois des virus. Par exemple A. JOFRE et al. [LWT Food Science and Technology 42(5) (2009) p.924-928, intitulé « Efficiency of high hydrostatic pressure at 600  
20 MPa against food-borne micro-organisms by challenge test convenience »] (Ref.2) décrivent l'application d'une pression de 600 MPa afin de sécuriser des aliments.

[008] D'autres procédés ont été utilisés afin d'inactiver des agents pathogènes, par exemple *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) dans du  
25 jambon (C.C. TASSOU et al. « Temperature-assisted high hydrostatic pressure inactivation of *Staphylococcus aureus* in a ham model system: evaluation in selective and non selective medium » J. Applied Microbiology 104 (2008), 1764-1773 (Ref.3). Les résultats obtenus ont montré qu'il était nécessaire d'appliquer une pression de 500 MPa à 20°C pendant 45  
30 minutes afin d'atteindre une réduction de 5 log de la quantité de

pathogènes présents. Une réduction de 6 log était atteinte à 400 MPa avec un chauffage du milieu à 55°C pendant les 7 premières minutes du traitement. Les pressions et températures utilisées dans cet article ne permettent pas le maintien de l'activité biologique du plasma sanguin humain.

[009] Des travaux antérieurs ont également mis en évidence qu'il était notamment nécessaire d'atteindre des valeurs élevées de la pression (environ 500 MPa) afin d'obtenir une réduction à température ordinaire, c'est-à-dire à 20°C de 6 log de la population de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) au sein d'un milieu modèle tel que le bouillon tryptone-sel [Y. RIGALDIE : « *Sur l'impact des traitements sous Hautes Pressions dans la décontamination et la stérilisation de formes pharmaceutiques renfermant des molécules thérapeutiques sensibles aux procédés énergétiques* » Thèse de l'Université Bordeaux 1 (01 juillet 2002) N°d'ordre 2526 (Ref. 4)].

Les valeurs élevées de la pression nécessaires pour inactiver certains pathogènes dont *S. aureus* sont une contrainte importante pour la mise au point d'un procédé d'inactivation d'un agent pathogène dans du plasma sanguin tout en conservant l'activité biologique dudit plasma.

[0010] Par ailleurs dans Y. RIGALDIE et al. [« *Pharmaceuticals perspectives of High Pressures : a soft tool for sterilization of fragile drugs* » Defect and Diffusion Forum 208-209 (2002), 55-58 (Ref. 5)] il a été montré d'une part que l'inactivation de *S. aureus* par un traitement Hautes Pressions en continu atteignait dans un milieu modèle (par exemple un bouillon tryptone-sel) environ 2,3 log pour un traitement de 10 minutes à 600 MPa et d'autre part que de basses températures (-17°C) avait peu d'effet sur l'inactivation par rapport à la température ambiante.

[0011] Il est connu que le plasma sanguin humain possède des propriétés biologiques spécifiques. En effet, le plasma comprend environ trois cents protéines différentes. Les protéines les plus représentées en proportion sont l'albumine, les anticorps ou Immunoglobulines, le fibrinogène, l'alpha 1 antitrypsine, l'alpha 2 macroglobuline, la transferrine,

les lipoprotéines (HDL et LDL). Il comprend également les facteurs de coagulation qui sont pris dans la plupart des cas comme référence pour mesurer l'activité biologique du plasma. Le plasma est « biologiquement actif » lorsque l'activité des facteurs de coagulation, notamment les facteurs VIIIc, V et XI présents dans le plasma est supérieure à 50% (Pharmacopée Européenne 5.6 01/2007 :1646 (Ref. 6). Le plasma peut, au travers de certaines de ses protéines, interagir avec les membranes de certains micro-organismes (A. KUNERT et al. The Journal of Immunology 179 (2007), 2979-2988 (Ref.7) ou induire la sporulation (l'introduction dans le plasma d'une suspension composée d'environ 50% de forme végétative de *B.subtilis* et de 50% de forme sporulée de *B. subtilis* conduit très rapidement à une sporulation quasi-totale).

[0012] Différentes études ont montré que le traitement du plasma sanguin à des pressions comprises entre 200 et 500 MPa à une température de -10°C n'était pas intéressante pour la conservation des produits sanguins et que cette méthode n'était pas à retenir pour l'inactivation de virus et de microorganismes dans les produits sanguins (A. M. MATSER et al. « High Pressure processing for preservation of blood products » High Pressure Research 25 (2005), p.37-41) (Ref.8).

[0013] La demande internationale WO 02/056824 (Ref. 9) décrit un procédé de stérilisation de produits sanguins utilisant des valeurs de pressions incompatibles avec la conservation de l'activité biologique du plasma sanguin. Différentes combinaisons de températures et pressions sont testées, cependant ces combinaisons ne permettent pas de maintenir l'activité des facteurs de coagulation VIIIc, V et XI afin d'obtenir un plasma sanguin humain biologiquement actif. Par ailleurs, dans ce document, les procédés diffèrent en fonction de l'agent pathogène ; ce qui rend ces procédés difficilement industrialisables.

[0014] D'autres essais ont été réalisés dans l'état de la technique afin d'inactiver *S. aureus* dans le plasma sanguin (« Deciphering Mechanisms for Infectious Agent Inactivation Using Cyclic High Pressure

or Pressure Cycling Technology » F. TAO et al. (BBI Inc.- Boston Biomedica Inc.) BIOPHYSICS 2003 – Poster 021604 (Ref.10).

[0015] Dans l'article de S. DUSING et al. [« *Inactivation of viruses in plasma by cycled pulses of high pressure* » Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology, Ed. R. HAYASHI, Elsevier Science BV (2002)] (Ref.11), seuls sont pris en compte le mode d'application de la pression, notamment des cycles de 60 secondes à hautes pressions c'est-à-dire entre environ 400 et 500 MPa, séparés par 300 secondes à pression ambiante et des basses températures c'est-à-dire environ -20°C. Les pressions utilisées dans ce document ne sont pas compatibles avec la conservation de l'activité biologique du plasma sanguin humain.

[0016] Aussi, il existe un réel besoin dans l'état de la technique palliant ces défauts, inconvénients et obstacles de l'art antérieur, en particulier d'un procédé permettant d'inactiver au moins un agent pathogène dans le plasma sanguin humain et permettant également de garder l'activité de protéines plasmatiques, par exemple les facteurs VIIIc, V et XI afin que le plasma soit biologiquement actif.

[0017] Il existe également un réel besoin dans l'état de la technique de trouver un procédé permettant d'inactiver au moins un agent pathogène dans le plasma sanguin humain et permettant également de garder l'activité biologique sans introduction de produits externes, par exemple des produits chimiques, et sans étape postérieure de purification afin d'éliminer des produits introduits susceptibles d'être toxiques, par exemple par accumulation ou tout autre processus.

[0018] En particulier, il existe un réel besoin dans l'état de la technique de trouver un procédé plus efficace permettant de réduire les coûts, de diminuer le temps nécessaire pour l'inactivation et d'améliorer l'efficacité d'inactivation d'au moins un agent pathogène tout en conservant l'activité biologique du plasma sanguin humain.

30

### **Description de l'invention**

[0019] La présente invention permet de résoudre notamment ces défauts, inconvénients et obstacles de l'art antérieur en fournissant un procédé d'inactivation d'au moins un agent pathogène d'un échantillon de plasma sanguin humain comprenant au moins 5 cycles comprenant chacun :

- la compression dudit échantillon de sa pression initiale  $P_0$  à une pression  $P_1$ ,  $P_1$  étant compris de 190 à 210 MPa, la température dudit plasma à la pression  $P_1$  étant comprise entre  $-10^{\circ}\text{C}$  et  $-3^{\circ}\text{C}$  du fait de la compression,
- le maintien éventuel de la pression  $P_1$  durant un temps compris de 110 à 130 secondes, et
- la détente de l'échantillon jusqu'à la pression  $P_0$ ,
- la vitesse d'augmentation de la pression pour ladite compression et la vitesse de diminution de la pression pour ladite détente sont réalisées à une vitesse  $v_1$  comprise de 47,5 à 52,5  $\text{MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ .

[0020] En d'autres termes, la présente invention a pour objet un procédé d'inactivation d'au moins un agent pathogène d'un échantillon de plasma sanguin humain comprenant au moins 5 cycles comprenant chacun :

- la compression dudit échantillon de sa pression initiale  $P_0$  à une pression  $P_1$ ,  $P_1$  étant compris de 190 à 210 MPa, la température dudit plasma à la pression  $P_1$  étant comprise entre  $-10^{\circ}\text{C}$  et  $-3^{\circ}\text{C}$  du fait de la compression,
- le maintien éventuel de la pression  $P_1$  durant un temps compris de 110 à 130 secondes, et
- la détente de l'échantillon jusqu'à la pression  $P_0$ ,
- ladite compression et ladite détente étant réalisée à une vitesse  $v_1$  de 47,5 à 52,5  $\text{MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ .

[0021] De manière surprenante et totalement inattendue, les inventeurs ont démontré que la combinaison des différents paramètres définis dans le procédé de l'invention permet d'inactiver au moins un agent pathogène avec une efficacité très supérieure aux procédés de l'état de la technique, et permet en outre de conserver l'activité biologique de l'échantillon de plasma sanguin humain traité.

[0022] En outre, les inventeurs ont montré que, de manière surprenante et inattendue, les caractéristiques du procédé de l'invention ont un effet synergique sur l'inactivation de cibles biologiques, par exemple au moins un agent pathogène, permettant ainsi d'inactiver lesdites cibles tout en conservant l'activité biologique de l'échantillon de plasma sanguin humain.

[0023] De plus le procédé de l'invention permet l'inactivation d'au moins un agent pathogène sans introduction de produits externes et ne nécessite pas d'étape de purification permettant ainsi de réduire le temps et les coûts de réalisation.

[0024] Le procédé de l'invention permet donc avantageusement d'inactiver au moins un agent pathogène présent dans le plasma sanguin humain mais également de conserver l'activité biologique dudit échantillon de plasma sanguin humain.

[0025] Dans la présente par « échantillon de plasma sanguin humain », il est entendu tout échantillon de plasma provenant d'un être humain quel que soit son origine, âge, sexe, taille et/ou poids. L'échantillon peut également avoir été préalablement traité par toute technique connue de l'homme du métier pour, par exemple, sa conservation, par exemple par congélation

[0026] Dans la présente par « inactivation », il est entendu la suppression de l'activité biologique d'au moins un agent pathogène ou d'un ensemble d'agents pathogènes. Par exemple, l'inactivation ne permet pas une reprise de l'activité biologique de l'agent pathogène. L'inactivation peut être constatée par toute méthode connue de l'homme du métier. Par

exemple, il peut s'agir de l'absence de croissance d'un agent pathogène dans un milieu adapté pour sa croissance et/ou de transmettre son activité pathogène [« *Pathogen inactivation techniques* » , J.P.R. PELLETIER, S. TRANSUE , E.L. SNYDER, Best Practice & Research Clinic Haematology vol.19 (1) (2006) ,pp.205-242 ] (Ref.12)

[0027] Dans la présente par « agent pathogène » il est entendu toute entité biologique connue de l'homme du métier. Par exemple, il peut s'agir d'une bactérie, d'une moisissure, d'un virus, d'une levure, d'une protéine infectieuse et/ou de parasites. Par exemple, l'agent pathogène peut être choisi dans le groupe comprenant les agents pathogènes de la pharmacopée européenne décrit dans Pharmacopée Européenne 6.0, 5.1 Textes Généraux sur la microbiologie 01 /2008 :50101 (Ref.13), par exemple il peut s'agir d'agents pathogènes responsables de maladies, par exemple *Candida albicans*, *Aspergillus Niger*, *Bacillus subtilis* ou encore responsables de maladies nosocomiales, par exemple *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

[0028] Dans la présente par « adiabatique », il est entendu l'accroissement ou la diminution de température résultant de la compression ou de la décompression notamment d'un constituant liquide ou gazeux dans un système clos en raison du premier principe de la thermodynamique. [E. HECHT « Physique » Editeur : De Boech (1999)] (Ref. 14)

[0029] Dans la présente la pression initiale  $P_0$  est par exemple la pression à laquelle se trouve l'échantillon avant la mise en œuvre du procédé de l'invention. Par exemple, la pression  $P_0$  peut être égale à la pression atmosphérique, ou toute pression de stockage de plasma sanguin inférieure à  $P_1$ . La pression initiale peut être, par exemple égale à environ 0,1 MPa.

[0030] Dans la présente par « vitesse d'augmentation et/ou de diminution de la pression », il est entendu une vitesse exprimée en Méga

Pascal par seconde (MPa. s<sup>-1</sup>). Elle peut être linéaire et/ou variable, dans ce dernier cas on parle alors plutôt de cinétique.

[0031] Selon l'invention, l'échantillon de plasma sanguin humain auquel est soumis le procédé de l'invention est de préférence contenu dans tout contenant connu de l'homme du métier pour être résistant aux pressions du procédé de l'invention. Par exemple, dans des contenants hermétiques et/ou déformables, par exemple un tube de prélèvement, une poche plastique pour transfusion, un récipient stérile, un emballage spécifique par exemple des emballages décrits dans Y. LAMBERT, G. DEMAZEAU, A. LARGETEAU, S. LABORDE-CROUBIT, M. CABANNES and J.M. BOUVIER, [« New packaging solutions for high pressure treatments of foods ». *High Pressure Research*. 2000, vol 19, 207-212] (Ref. 15).

[0032] Par exemple, l'emballage peut comprendre une surface interne en contact avec le plasma compatible chimiquement et biologiquement avec le plasma et une surface externe en contact avec le milieu transmetteur compatible chimiquement avec ce dernier, par exemple en terme de perméabilité, etc..... tel que décrit dans la Pharmacopée Européenne 5.0 01/2005 : 30203 (Ref. 16)

[0033] L'emballage peut par exemple comprendre une connectique, c'est-à-dire des moyens permettant de remplir et/ou de vider l'emballage. Par exemple, une connectique peut permettre le remplissage et/ou l'utilisation, par exemple thérapeutique du plasma sanguin humain après mise en œuvre d'un procédé selon l'invention.

[0034] Par exemple, l'emballage hermétique peut être tout emballage connu de l'homme du métier répondant de préférence aux 4 critères suivants : (i) la conservation de l'herméticité dudit emballage et sa connectique, (ii) la compatibilité chimique entre la surface intérieure de l'emballage et de sa connectique avec le plasma, et avec un milieu transmetteur de pression pour sa partie externe, (iii) le maintien des propriétés barrières notamment afin d'éviter tout transfert gazeux ou de

molécules chimiques au travers de la paroi, (iv) la sauvegarde de l'intégrité chimique de l'emballage, c'est-à-dire le non relargage de molécules chimiques vers le contenant plasma.

5 [0035] Dans la présente, la pression peut être appliquée de manière isostatique au moyen d'un liquide transmetteur de pression.

[0036] Dans la présente par « application de la pression de manière isostatique », il est entendu l'application uniforme de la pression en tout point de l'échantillon.

10 [0037] Dans la présente par « milieu transmetteur », il est entendu tout milieu connu de l'homme du métier susceptible d'être utilisé dans le procédé de l'invention. Par exemple, il peut s'agir d'un milieu liquide ou gazeux. Par exemple, il peut s'agir d'un milieu liquide facile à mettre en œuvre et souvent choisi en fonction de sa température de fusion, notamment lors de son utilisation à basse température, par exemple un milieu dont la température de fusion est inférieure à la température de traitement de l'échantillon par exemple un milieu liquide apolaire, par exemple l'hexane, le glycol ou d'un milieu polaire, par exemple le propanol, le n-butanol, l'éthanol, l'acide acétique, l'isopropanol, de préférence le milieu liquide transmetteur est choisi dans le groupe comprenant un mélange glycol et eau, par exemple le Kryo 30 Lauda, et l'éthanol.

15 [0038] L'application de la pression de manière isostatique permet avantageusement de comprimer et de détendre de manière uniforme et sans gradient de pression en tout point de l'échantillon.

20 [0039] Dans la présente par « activité biologique d'un échantillon de plasma sanguin humain », il est entendu une activité des facteurs VIIIc, V et XI présents dans le plasma supérieure à 50% telle qu'indiquée par la norme de la Pharmacopée Européenne relative au plasma humain viro-inactivé (Pharmacopée Européenne 5.6 01/2007 :1646 (Ref.6) et/ou supérieure à 70% pour le facteur VIIIc et supérieure à 50% pour les facteurs V et XI telle que requise par la Législation française (Réf.17).

30

- [0040] Dans la présente, la température initiale  $T_0$  de l'échantillon avant compression peut être choisie, par exemple, en fonction de la vitesse de montée en pression  $v_1$ , de la nature chimique du milieu transmetteur de pression et de la valeur de la pression. Par exemple, la température initiale peut être comprise de  $-18^{\circ}\text{C}$  à  $-3^{\circ}\text{C}$ .
- [0041] Selon un mode particulier de réalisation du procédé de l'invention, la compression et/ou la détente sont adiabatiques.
- [0042] Dans la présente invention, la pression  $P_1$  peut être égale à 200 MPa.
- 10 [0043] Dans la présente la température dudit plasma à la pression  $P_1$  peut être comprise de  $-10^{\circ}\text{C}$  à  $-3^{\circ}\text{C}$ , de préférence de  $-8^{\circ}\text{C}$  à  $-4^{\circ}\text{C}$ , de manière encore plus préférée égale à environ  $-5^{\circ}\text{C}$ .
- [0044] Dans la présente invention, la pression  $P_1$  peut être maintenue pendant une durée de 110 à 130 secondes par cycle, par exemple pendant une durée de 120 secondes par cycle.
- 15 [0045] La présente invention a également pour objet l'utilisation du procédé défini précédemment pour l'inactivation d'au moins un agent pathogène et/ou d'un ensemble d'agents pathogènes dans le plasma sanguin humain.
- 20 [0046] La présente invention a également pour objet le plasma sanguin humain obtenu par le procédé défini précédemment.
- [0047] Le plasma sanguin humain obtenu par le procédé de l'invention peut être avantageusement utilisé dans le domaine médical, par exemple pour le traitement de différentes pathologies, pour des transfusions comme décrit dans le document de l'Agence Française de
- 25 Sécurité Sanitaire des Produits de Santé « Transfusion de plasma frais congelé : produits, indications » (2002) (Réf. 18) et/ou toute autre pathologie.
- [0048] Le plasma obtenu par le procédé de l'invention possède de
- 30 manière avantageuse les propriétés biologiques du plasma sanguin

humain selon les normes de la pharmacopée européenne et également de la Législation Française.

[0049] D'autres avantages pourront encore apparaître à l'homme du métier à la lecture des exemples ci-dessous, illustrés par les figures annexées, donnés à titre illustratif.

### **Brève description des figures**

- Les figures 1 A à C sont des histogrammes représentant le pourcentage d'activité de protéines plasmatiques (ordonnée) en fonction de la pression en Méga Pascal (MPa) (abscisse). En particulier, elles représentent respectivement l'effet de la valeur de la pression sur l'activité du facteur de coagulation VIIIc (figure 1A), du facteur de coagulation V (figure 1B), du facteur de coagulation XI (figure 1C), la vitesse d'application est de 3,33 MPa. s<sup>-1</sup>, le temps d'application, également dénommé maintien de la pression, de 10 minutes à température ambiante.

- Les figures 2 A à C sont des histogrammes représentant le pourcentage d'activité de protéines plasmatiques (ordonnée) en fonction de la pression en MPa (abscisse) pour trois vitesses différentes d'application de la pression. En particulier, elles représentent respectivement l'effet de la vitesse d'application de la pression sur l'activité du facteur de coagulation VIIIc (figure 2A), du facteur de coagulation V (figure 2B), du facteur de coagulation XI (figure 2C) pour différentes valeurs de la pression (100, 150, 200 et 250 MPa), la pression étant appliquée pendant 10 minutes à température ambiante.

- Les figures 3 A à C sont des histogrammes représentant le pourcentage d'activité de protéines plasmatiques (ordonnée) en fonction de la pression en MPa (abscisse) et de différents modes d'application la pression et pour une même durée totale de traitement. La vitesse d'application de la pression est de 3,33 MPa.s<sup>-1</sup> à température ambiante. En particulier, les figures 3A, 3B et 3C représentent respectivement l'effet du mode d'application de la pression sur l'activité des facteurs de coagulation VIIIc,

V et XI en mode continu (10 minutes), modes cycliques (5 cycles de 2 minutes et 20 cycles de 30 secondes).

5 - Les figures 4 A à C sont des histogrammes représentant le pourcentage d'activité de protéines plasmatiques (ordonnée) en fonction de la pression en MPa (abscisse) pour deux valeurs de la température : ambiante et -15°C. La vitesse d'application de la pression est supérieure ou égale à 50 MPa.s<sup>-1</sup> et le temps d'application de la pression de 10 minutes. En particulier, les figures 4A, 4B et 4C représentent respectivement l'effet de la température sur l'activité des facteurs de coagulation en fonction de la  
10 valeur de la pression.

- Les figures 5 A à C sont des histogrammes représentant le pourcentage d'activité de protéines plasmatiques (ordonnée) en fonction de la pression en MPa (abscisse), de la vitesse d'application de la pression et de la température. En particulier, les figures 5 A à C représentent  
15 respectivement l'effet de la combinaison d'une vitesse d'application rapide, d'une application cyclique de la pression et des températures sur l'activité des facteurs de coagulation VIIIc, V et XI, la vitesse d'application étant supérieure ou égale à 50 MPa.s<sup>-1</sup>, le temps d'application de 2 minutes répété 5 fois et la température de -15°C.

20 - La figure 6 est un diagramme représentant l'inactivation de *Staphylococcus aureus* dans du plasma sanguin humain (ordonnée) en fonction de la température (abscisse) pour une combinaison de paramètres caractéristiques du traitement : une vitesse d'application de la pression de 50 MPa.s<sup>-1</sup>, d'un mode d'application cyclique de la pression de 5 cycles de  
25 2 min et pour une pression de 200 MPa. En particulier, cette figure représente l'effet drastique de la température sur l'inactivation par des hautes pressions de *Staphylococcus aureus* en suspension dans du plasma sanguin humain.

- La figure 7 est un diagramme représentant l'inactivation de  
30 *Staphylococcus aureus* (ordonnée) en fonction de la température

(abscisse) dans du plasma sanguin humain pour des valeurs croissantes de pression allant de 200 à 300 MPa.

- 5 - La figure 8 est un diagramme représentant l'inactivation de *S. aureus*, de *P. aeruginosa*, de *A. niger* et de *C. albicans* (ordonnée) en fonction de la température (abscisse). En particulier, cette figure représente l'effet de la température sur l'inactivation de 4 microorganismes mis en suspension dans un échantillon de plasma sanguin humain.
- 10 - La figure 9 est un histogramme représentant l'inactivation de *Staphylococcus aureus* (ordonnée) en fonction de la pression (abscisse) et de la vitesse d'application de la pression. En particulier, cette figure représente l'effet de la vitesse d'application de la pression sur l'inactivation de *Staphylococcus aureus* en suspension dans du plasma sanguin humain en sélectionnant comme mode d'application de la pression 5 cycles de 2 minutes et une température de -5°C environ.
- 15 - La figure 10 est un histogramme représentant le pourcentage d'activité de facteurs de coagulation (ordonnée) en fonction de la pression (abscisse) pour diverses valeurs de la vitesse d'application de la pression. La figure 10A représente le pourcentage d'activité du facteur VIIIc (FVIIIc) et la figure 10B le pourcentage d'activité du facteur V (FV). En particulier, cette
- 20 figure représente l'effet de la vitesse d'application de la pression sur l'activité des facteurs de coagulation au cours d'un traitement cyclique (5×2min) à basse température (Température d'environ -5°C).
- La figure 11 est une photographie représentant l'observation au microscope optique (Objectif ×100) de sang contaminé par *Plasmodium*
- 25 *berghei* avant (A) et après traitement par le « Procédé Hautes Pressions de Sécurisation du Plasma » (B). (N : Noyau, C : Cytoplasme, V : Vacuole)
- La figure 12 représente le résultat d'une analyse par Western Blot d'échantillons de plasma sanguin humain infectés ou non par la protéine infectieuse du prion de hamster (263 K), Tlx : Témoin infecté non traité par le procédé, HPlx : Echantillon infecté traité par le procédé, TNx : Témoin
- 30

négatif non traité par le procédé, HPNx : Témoin négatif traité par le procédé.

5 - La figure 13 est un histogramme représentant l'efficacité destructrice (ED) (ordonnée) en fonction de la pression (abscisse). La vitesse d'application de la pression était de  $3.33 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ , le mode d'application (MA) continu, la durée de traitement de 10 minutes et la température de traitement de  $25^\circ\text{C}$ .

10 - La figure 14 est un histogramme représentant l'efficacité destructrice (ED) (ordonnée) en fonction de la pression (abscisse). La vitesse d'application de la pression était de  $3.33 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$  (bâtons pleins) ou de  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$  (bâtons hachurés).

15 - La figure 15 est un histogramme représentant l'efficacité destructrice (ED) (ordonnée) en fonction de la pression (abscisse). La vitesse d'application de la pression était de  $3.33 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ . Le mode d'application de la pression était de 5 cycles de 2 minutes (bâtons hachurés), de 20 cycles de 30 secondes (bâtons vides) ou d'un cycle de 10 minutes (bâtons pleins)

- La figure 16 est un histogramme représentant l'efficacité destructrice (ED) (ordonnée) en fonction de la pression (abscisse). La température était de  $-5^\circ\text{C}$  (bâtons hachurés) ou de  $25^\circ\text{C}$  (bâtons pleins)

20 - La figure 17 est un diagramme représentant l'inactivation de *S. aureus*, de *P. aeruginosa*, de *A. niger*, de *C. albicans* et de *B. subtilis* (ordonnée) en fonction de la température (abscisse).

25 - Les figures 18 A et B sont des histogrammes représentant le pourcentage d'activité de protéines plasmatiques (%act) (ordonnée) en fonction de la pression (P) en Méga Pascal (MPa) (abscisse). En particulier, elles représentent respectivement l'effet de la valeur de la pression sur l'activité du facteur de coagulation VIIIc (figure 18A), du facteur de coagulation V (figure 18B).

30 - La figure 19 représente l'intensité de la fluorescence (ordonnée) en fonction du facteur de dilution (abscisse). Les croix correspondent aux

résultats obtenus avec le procédé (HP), les carrés noirs aux résultats obtenus avec un témoin « T ».

5 - La figure 20 représente l'intensité de la fluorescence (ordonnée) en fonction du facteur de dilution (abscisse). Les croix correspondent aux résultats obtenus avec le procédé (HP), les carrés noirs aux résultats obtenus avec un témoin « T ».

10 - La figure 21 représente les diagrammes de FACS. Sur les diagrammes SSC correspond au signal corrélé à la complexité cellulaire, FSC :signal corrélé à la taille relative des cellules, « event » au nombre total d'événements (cellule) dans la population définie, %Parent au nombre d'événements dans la population définie par le nombre total d'événements exprimé en pourcentage et « mean » à la valeur moyenne de l'intensité de fluorescence.

15

## EXEMPLES

### 20 **Exemple 1 : mesure de l'activité biologique du plasma sanguin humain après traitement sous hautes pressions**

[0050] Des échantillons de 4 mL environ de plasma sanguin humain frais ont été prélevés et placés dans des tubes étanches, puis mis à congeler à -30°C dans l'attente d'être traités sous hautes pressions.

25 [0051] Les conditions de traitement étaient les suivantes : une vitesse d'application de la pression de 100 MPa en 30 secondes (3,33 MPa.s<sup>-1</sup>), une durée de traitement de 10 minutes de manière continue à la pression désirée, c'est à dire de 100 MPa à 250 MPa et une température ambiante de l'ordre de 20°C.

30 [0052] Les échantillons ont été placés dans un dispositif générateur de hautes pressions en phase liquide par compression directe de type

« Framatome », le milieu transmetteur était le mélange glycol/eau (Kryo 30 Lauda).

[0053] Par application continue de la pression, il est entendu une application constante de la pression à une valeur donnée.

5 [0054] L'activité des facteurs de coagulation : facteur VIIIc, facteur V et facteur XI a été choisie comme référence afin de déterminer l'activité biologique du plasma sanguin humain. Cette activité a été déterminée avant et après traitement par la méthode du temps de céphaline avec activateur décrite dans la notice d'utilisation STA C.K. PREST  
10 (Diagnostica Stago) (Réf 19). Ce dosage consiste à mesurer, en présence de céphaline et d'activateur, le temps de coagulation d'un plasma immuno-déplété en facteur à doser, le facteur de coagulation manquant étant apporté par l'échantillon à tester. Pour chaque facteur de coagulation, le pourcentage d'activité résiduelle est ensuite déterminé par le rapport entre  
15 la valeur d'activité après traitement hautes pressions et la valeur d'activité avant traitement hautes pressions. L'effet de la valeur de la pression sur le pourcentage d'activité résiduelle pour ces trois facteurs de coagulation est présenté sur les figures 1 A à C.

[0055] L'analyse de l'activité résiduelle des facteurs de coagulation  
20 vis-à-vis de la pression, présentée sur la figure 1, a montré que l'activité du facteur XI était peu affectée après traitement à des pressions de 100 MPa et 250 MPa (soit 1000 bar et 2500 bar), en revanche les facteurs VIIIc et V étaient, dans ce domaine de pression, très sensibles à la pression entraînant une forte perte d'activité, c'est-à-dire de l'ordre de 80 à 100%  
25 pour une pression d'environ 250 MPa.

[0056] Tel que démontré dans cet exemple, le traitement du plasma sanguin à des pressions croissantes de 100 MPa à 250 MPa entraîne une forte diminution de l'activité des facteurs VIIIc et V ce qui conduit à considérer que tout procédé de sécurisation du plasma sanguin humain,  
30 c'est-à-dire tout procédé permettant l'inactivation des micro-organismes pathogènes par application de hautes pressions, s'accompagne d'une

perte d'activité importante de l'activité des facteurs de coagulation et donc de la perte de l'activité biologique du plasma sanguin.

**Exemple 2 : mesure de l'activité biologique du plasma sanguin humain après traitement sous hautes pressions en fonction de la vitesse d'application de la pression**

[0057] Du plasma sanguin humain frais a été préparé selon le procédé décrit dans l'exemple 1. Les conditions de traitement étaient : une durée de traitement de 10 minutes de manière continue à une pression donnée allant de 100 à 250 MPa, à une température de l'ordre de 20°C.

[0058] La vitesse d'application de la pression a été choisie comme variable. Dans cet exemple, trois vitesses ont été choisies avec des valeurs suffisamment différentes d'une part et des valeurs accessibles pour un équipement industriel réalisé par l'Homme de l'Art d'autre part, c'est-à-dire 100 MPa en 30 secondes (ou  $3,33 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (valeur identique à la vitesse d'application de la pression utilisée dans l'exemple 1), 100 MPa en 12 secondes ( $8,33 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ) et 100 MPa en 2 secondes ( $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

[0059] Les échantillons ont été placés dans un dispositif générateur de hautes pressions en phase liquide par compression directe de type « Framatome » et le milieu transmetteur était le mélange glycol/eau (Kryo 30 Lauda) pour les vitesses de  $3,33 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$  et  $8,33 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ . Un équipement générateur de hautes pressions par compression indirecte mis en place en interne avec comme milieu transmetteur l'éthanol a été utilisé pour la vitesse de  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ .

[0060] L'activité biologique du plasma sanguin humain a été mesurée après traitement par le pourcentage d'activité des facteurs de coagulation tel que décrit dans l'exemple 1 (facteur VIIIc, facteur V et facteur XI) mesuré par la méthode du temps de céphaline avec activateur

[0061] Les pourcentages d'activité résiduelle par rapport à l'activité avant traitement hautes pressions de chacun des facteurs de coagulation pour les mêmes valeurs de pression mais avec des vitesses d'application

de la pression variables :  $3,33 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $8,33 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$  et  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$  sont représentés sur la figure 2.

[0062] L'analyse des résultats présentés sur la figure 2 a montré que la vitesse d'application de la pression dans le domaine allant de  $3,33 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$  à  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ , quelle que soit la valeur de la pression de traitement et quelle que soit la nature du facteur de coagulation (facteur VIIIc, facteur V, facteur XI) a peu d'effet (aux erreurs expérimentales près) sur l'activité des facteurs de coagulation, au moins pour des pressions comprises entre 100 MPa et 250 MPa.

10 [0063] L'absence d'effet de la vitesse d'application de la pression sur l'activité biologique du plasma est surprenante compte tenu de l'enseignement technique décrit dans la littérature, par exemple dans la demande internationale WO 00/48641 (Ref. 20) qui préconise des accroissements de pression très rapides, allant jusqu'à  $1000 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ . De plus, l'application de ces accroissements très rapides de pression sont très difficiles à mettre en œuvre avec un équipement industriel.

### **Exemple 3 : mesure de l'activité biologique du plasma sanguin humain après traitement sous hautes pressions en fonction du mode d'application de la pression**

20 [0064] Du plasma sanguin humain frais a été préparé selon le procédé décrit dans l'exemple 1. Les conditions de traitement sous hautes pressions étaient : une vitesse d'application de la pression constante, égale à 100 MPa en 30 secondes (soit  $3,33 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ), la température de l'ordre de  $20^\circ\text{C}$ , une durée de traitement de 10 minutes à une pression variant de 100 à 250 MPa.

[0065] Les échantillons ont été placés dans un dispositif générateur de hautes pressions en phase liquide par compression directe de type « Framatome » et le milieu transmetteur était le mélange glycol/eau (Kryo 30 Lauda).

- [0066] Le mode d'application de la pression varie selon un mode continu, c'est-à-dire le maintien de la pression constante pendant un temps de 10 minutes, ou un mode cyclique, c'est-à-dire 5 cycles de 2 minutes à la pression sélectionnée ou 20 cycles de 30 secondes à la pression sélectionnée. Les cycles correspondent, par exemple à une compression de l'échantillon, le maintien de la pression pendant un temps approprié et la détente de l'échantillon. La durée des cycles a été choisie de telle manière qu'elle puisse être transposable à l'échelle industrielle.
- [0067] L'activité biologique du plasma sanguin humain a été mesurée par le pourcentage d'activité résiduelle des facteurs de coagulation tel que décrit dans l'exemple 1 (facteur VIIIc, facteur V et facteur XI). L'activité de ces facteurs de coagulation a été mesurée par la méthode du temps de céphaline avec activateur décrite dans la notice d'utilisation STA C.K. PREST (Diagnostica Stago) (Réf 19).
- [0068] Les valeurs obtenues pour l'activité résiduelle des trois facteurs de coagulation pris comme références à l'issue de ces trois types de traitement (un en mode continu et deux en mode cyclique) pour une vitesse d'application de la pression correspondant à  $3,33 \text{ MPa.s}^{-1}$  et une température de l'ordre de  $20^\circ\text{C}$  sont données sur la figure 3.
- [0069] La comparaison de l'application d'une pression en mode cyclique (5 cycles de 2 minutes) par rapport à une application en mode continu pour une même durée de 10 minutes et pour une même valeur de la pression appliquée (la vitesse d'application et la température étant constantes) montre une différence de comportement entre le facteur VIIIc et le facteur V.
- [0070] Le facteur XI présentait toujours un comportement particulier par rapport aux deux autres facteurs de coagulation dans la mesure où son activité était peu ou pas (aux erreurs d'expérience près) perturbée par la pression.
- [0071] Tel que démontré dans cet exemple, le facteur V est plus sensible que le facteur VIIIc au mode d'application cyclique de la pression,

c'est-à-dire que son activité résiduelle apparaît davantage sauvegardée pour une application cyclique que pour une application continue pour une même valeur de la pression.

[0072] De plus de manière inattendue et surprenante, ce  
5 phénomène est plus accentué pour un mode cyclique correspondant à 5 cycles de 2 minutes par rapport à 20 cycles de 30 secondes.

**Exemple 4 : mesure de l'activité biologique du plasma sanguin  
humain après traitement sous hautes pressions en fonction de la  
10 température**

[0073] Du plasma sanguin humain frais a été préparé selon le  
procédé décrit dans l'exemple 1.

[0074] Les conditions de traitement étaient : une vitesse  
d'application de la pression constante et égale à  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ , une durée de  
15 traitement en continu de 10 minutes à une pression comprise entre 100 et 300 MPa.

[0075] Les échantillons ont été placés dans un équipement  
générateur de hautes pressions par compression indirecte mis en place en  
interne avec comme milieu transmetteur l'éthanol.

[0076] Dans cet exemple, deux températures différentes de  
20 traitement ont été testées, soit la température ambiante (approximativement  $20^\circ\text{C}$ ), soit une température négative voisine de  $-15^\circ\text{C}$ .

[0077] La mesure de l'activité biologique du plasma sanguin humain  
a été mesurée par le pourcentage d'activité résiduelle des facteurs de  
25 coagulation tel que décrit dans l'exemple 1 (facteur VIIIc, facteur V et facteur XI) mesurée par la méthode du temps de céphaline avec activateur décrite dans la notice d'utilisation STA C.K. PREST (Diagnostica Stago) (Réf 19).

[0078] Les pourcentages d'activité résiduelle (par rapport à l'activité  
30 avant traitement hautes pressions) des trois facteurs de coagulation pris comme références à l'issue de ces traitements (pour une vitesse

d'application de la pression de 100 MPa en 2 secondes (soit  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ), une durée de traitement de 10 minutes en mode continu) mais avec deux températures différentes ( $20^\circ\text{C}$  et  $-15^\circ\text{C}$  environ) sont données sur la figure 4.

5 [0079] Il apparaît de manière surprenante et inattendue que les trois facteurs de coagulation ont des comportements différents vis-à-vis de la variation de température (entre  $20^\circ\text{C}$  et  $-15^\circ\text{C}$  environ). Le facteur XI demeure insensible à la température, dans les limites des erreurs expérimentales, et conserve une activité proche de 90%, quelles que  
10 soient les conditions. En revanche, la sauvegarde d'activité des facteurs VIIIc et V est favorisée à basses températures, en particulier c'est pour le facteur V que ce phénomène semble le plus amplifié. Par exemple à 220 MPa à  $-15^\circ\text{C}$ , l'activité du facteur V est supérieure à 50% (et répond donc aux normes de la Pharmacopée Européenne), alors que dans les mêmes  
15 conditions de pression mais à température ambiante, c'est à dire à  $20^\circ\text{C}$  environ, elle est très faible (environ 10%).

[0080] Tel que démontré dans cet exemple, un effet de synergie important entre basse température et vitesse d'application de la pression existe pour la conservation de l'activité des facteurs VIIIc et V, nettement  
20 amplifié pour le facteur V.

**Exemple 5 : mesure de l'activité biologique du plasma sanguin humain après traitement sous hautes pressions en associant trois paramètres caractéristiques du traitement : la vitesse d'application de la pression, le mode d'application de la pression et une basse température**

25 [0081] Du plasma sanguin humain frais a été préparé selon la procédure détaillée dans l'exemple 1.

[0082] Les échantillons ont été placés dans un équipement  
30 générateur de hautes pressions par compression indirecte mis en place en interne avec comme milieu transmetteur l'éthanol.

[0083] Le procédé de traitement a consisté à associer un ensemble de paramètres associés à la pression : vitesse d'application de la pression, mode d'application de la pression et température, en particulier basse température, c'est à dire une température de -15°C environ.

5 [0084] Différentes valeurs de la pression comprises entre 100 MPa et 250 MPa ont été testées. Les valeurs des paramètres associés ont été de 50 MPa.s<sup>-1</sup> pour la vitesse d'application de la pression, de 5 cycles de 2 minutes pour le mode d'application et une température de -15°C environ.

10 [0085] Le pourcentage d'activité résiduelle des facteurs de coagulation pris déjà comme références dans l'exemple 1 (facteur VIIIc, facteur V et facteur XI) a été comme dans l'exemple 1 mesurée par la méthode du temps de céphaline avec activateur.

15 [0086] Les pourcentages d'activité résiduelle (par rapport à l'activité avant traitement hautes pressions) des trois facteurs de coagulation, à l'issue d'un traitement dans les conditions décrites ci-dessus, sont montrés sur la figure 5.

20 [0087] Tel que démontré dans cet exemple, de manière surprenante et inattendue, un très grand effet de synergie est observé au travers de la combinaison des paramètres associés au paramètre pression pour les facteurs VIIIc et V (l'effet le plus important étant observé pour le facteur V). Par exemple à 240 MPa (soit 2400 bar) l'activité du facteur V est de l'ordre de 90% et celle du facteur VIIIc voisine de 70%. Ces valeurs d'activités sont compatibles avec la Législation française (J.O. n°123 du 28 mai 2003, Arrêté du 29 avril 2003 fixant la liste et les caractéristiques des produits sanguins labiles) (Réf 17) et permet, en outre l'utilisation thérapeutique du plasma sanguin humain obtenu.

25 [0088] Si l'on se réfère à l'exemple N°1 où seule la valeur de la pression était prise en compte, on observait à 250 MPa une valeur de l'activité proche de 10% pour le facteur VIIIc et proche de zéro pour le facteur V.

30

[0089] Tel que démontré dans cet exemple, la combinaison des 3 paramètres associés à la pression : vitesse d'application de la pression, mode d'application de la pression et température permet de manière surprenante le maintien de l'activité des facteurs de coagulation et donc le maintien de l'activité biologique du plasma sanguin humain.

**Exemple 6 : exemple d'inactivation d'un agent pathogène dans le plasma sanguin humain sous hautes pressions en fonction de la température.**

10 [0090] *Staphylococcus aureus* est un agent pathogène bien identifié et provoque de nombreuses maladies nosocomiales. Cet agent pathogène a été choisi comme modèle dans cet exemple.

[0091] Une suspension dense, c'est à dire supérieure à  $10^8$  UFC/mL (UFC : Unité Formant Colonie) de *S. aureus* (ATCC 6538) a été préparée dans du bouillon tryptone-sel (TS) (AES Chemunex) à partir d'une culture de 48h sur gélose trypticase soja (TCS) (AES Chemunex). Cette suspension a servi à contaminer du plasma sanguin humain à raison de 10 mL de suspension pour 300 mL de plasma.

[0092] Les échantillons de plasma contaminés ont alors été placés dans des tubes stériles et étanches, puis conservés au congélateur dans l'attente de traitement par un procédé d'inactivation.

[0093] Avant et après procédé d'inactivation, un dénombrement des échantillons est réalisé afin de déterminer l'efficacité destructrice de ce traitement. Pour cela, des dilutions en cascade des échantillons sont réalisées dans du bouillon TS. Pour chaque dilution, deux boîtes de pétri sontensemencées de la manière suivante : 1 mL de la dilution est placé au fond de la boîte puis de la gélose TCS en surfusion est versée. Après homogénéisation et gélification, les boîtes de pétri sont mises à l'étuve à 35°C pendant 48h. Les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies isolées sont ensuite sélectionnées pour le dénombrement, et, après comptage des

colonies, la concentration en *S. aureus* est déterminée par le calcul suivant :

$$N = \frac{\Sigma c}{(n_1 + 0,1 \times n_2) \times d}$$

avec N : concentration en *S. aureus* (en UFC/mL)

5             $\Sigma c$ : somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues

$n_1$  : nombre de boîtes retenues à la première dilution

$n_2$  : nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution

d : taux de dilution de la première dilution

10            [0094]    L'efficacité destructrice du traitement est ensuite calculée de la façon suivante :

$$ED = -\log\left(\frac{N}{N_0}\right)$$

avec ED : efficacité destructrice

15            N : concentration en *S. aureus* après traitement hautes pressions

$N_0$  : concentration en *S. aureus* avant traitement hautes pressions

[0095]            Le traitement d'inactivation mis en œuvre était celui décrit à l'exemple N°5. Pour une valeur constante de la pression (200 MPa), les  
20            valeurs des paramètres associés ont été une vitesse de 50 MPa.s<sup>-1</sup>, 5 cycles de 2 minutes pour le mode d'application. Seule la température a été prise en compte comme variable (de -25°C environ à +35°C environ).

[0096]            Les échantillons ont été placés dans un équipement  
générateur de hautes pressions par compression indirecte mis en place en  
25            interne avec comme milieu transmetteur l'éthanol.

[0097]            La figure 6 montre l'effet de la température au cours d'un tel traitement sur son efficacité destructrice vis-à-vis de *S. aureus*.

[0098]            De manière tout à fait inattendue et surprenante, il apparaît un domaine étroit en température entre -10°C et -5°C où l'efficacité

destructrice de *S. aureus* est amplifiée. Ce même phénomène est observé en changeant avec le même appareillage la nature du milieu transmetteur : le mélange glycol/eau (Kryo 30 Lauda) au lieu de l'éthanol. Pour les très basses températures (température inférieure à  $-10^{\circ}\text{C}$ ), le rôle de la température semble critique puisque la sensibilité de *S. aureus* vis-à-vis du traitement imposé décroît très rapidement (l'efficacité destructrice ED diminuant drastiquement) alors que la variation est plus progressive pour les températures supérieures à  $-5^{\circ}\text{C}$ .

[0099] Tel que démontré dans cet exemple, un exemple de procédé de l'invention via la combinaison appropriée des 3 paramètres associés à la valeur de la pression: vitesse d'application de la pression, mode d'application de la pression et température a un effet synergique sur l'inactivation de *S. aureus*.

[00100] En outre et de manière très surprenante, il apparaît comme représenté sur la figure 6 qu'il existe un domaine de température où l'inactivation de *S. aureus* est exacerbée. Par exemple entre  $-15^{\circ}\text{C}$  et  $-10^{\circ}\text{C}$  l'efficacité destructrice passe de 1,5 à sensiblement 5 ce qui constitue un accroissement tout à fait inattendu.

#### 20 **Exemple 7 : exemple d'inactivation d'un agent pathogène dans le plasma sanguin humain sous hautes pressions en fonction de la température et de la valeur de la pression**

[00101] Dans l'exemple 6, la valeur de la pression avait été fixée à 200 MPa. Tout en conservant les valeurs des paramètres associés à la pression (vitesse d'application de  $50 \text{ MPa} \cdot \text{s}^{-1}$  et mode d'application cyclique de 5 cycles de 2 minutes), les inventeurs ont cherché à évaluer si l'effet surprenant lié à une amplification de l'efficacité destructrice de *S. aureus* pour un domaine étroit de température pouvait être observé pour diverses valeurs de la pression (200 MPa, 250 MPa, 300 MPa).

[00102] En d'autres termes, cet exemple a pour but d'étudier si l'inactivation de *S. aureus* observée à 200 MPa peut être également observée à d'autres pressions, en particulier à 250 MPa et 300 MPa.

5 [00103] Les méthodes de préparation et de dénombrement des échantillons sont identiques à celles décrites dans l'exemple N°6.

[00104] Les échantillons ont été placés dans un équipement générateur de hautes pressions mis en place en interne avec comme milieu transmetteur l'éthanol.

10 [00105] L'analyse de la figure 7 donnant l'évolution de l'efficacité destructrice de *S. aureus* en fonction de la température pour trois valeurs de la pression, tous les autres paramètres associés au traitement demeurant constants (vitesse d'application de 50 MPa.s<sup>-1</sup> et mode d'application cyclique de 5 cycles de 2 minutes) montre un phénomène tout à fait particulier.

15 [00106] Tel que démontré dans cet exemple, dans un domaine de pression compris entre 200 et 300 MPa, il semble que l'inactivation du pathogène soit maximum dans un intervalle de température particulier et étroit de -5°C±2 °C.

20 [00107] En outre, il est surprenant que le phénomène d'amplification de l'inactivation de *S. aureus* puisse être observé dans un intervalle de pression, l'inactivation destructrice augmentant lorsque la pression croît.

25 **Exemple 8 : exemple d'inactivation d'agents pathogènes dans le plasma sanguin humain sous hautes pressions en fonction de la température.**

[00108] Dans l'exemple 6, la valeur de la pression avait été fixée à 200 MPa. Dans cet exemple, les valeurs des paramètres associés à la pression étaient les suivants : vitesse d'application de 50 MPa.s<sup>-1</sup> et mode d'application cyclique de 5 cycles de 2 minutes. Les inventeurs ont cherché  
30 à déterminer si l'effet surprenant lié à une amplification de l'efficacité destructrice de *S. aureus* dans un intervalle de température particulier était

observé pour d'autres agents pathogènes de la Pharmacopée Européenne tels que *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Candida albicans* (ATCC 10231) et *Aspergillus niger* (ATCC 16404) en maintenant 200 MPa comme valeur de la pression (Figure 8).

5 [00109] Les méthodes de préparation et de dénombrement des échantillons de plasma contaminé par *S. aureus* et *P.aeruginosa* sont identiques à celles décrites dans l'exemple 6. Pour *C. albicans* et *A. niger*, le protocole est identique à l'exception du milieu de culture qui est la gélose Sabouraud (AES Chemunex) et de la température d'incubation qui  
10 est de 28°C. Les spores de *A. niger* ont été obtenues en laissant incuber la souche pendant 14 jours à 28°C dans des fioles de Roux contenant de la gélose Sabouraud et ont été récupérées en lavant ces fioles à l'aide d'un mélange d'eau et de Tween 80 (0,5 g/L) en présence de billes de verre.

[00110] Les échantillons ont été placés dans un équipement  
15 générateur de hautes pressions par compression indirecte mis en place en interne avec comme milieu transmetteur l'éthanol.

[00111] L'analyse de la figure 8 démontre de manière tout à fait  
surprenante et inattendue malgré des différences très importantes au  
niveau de la structure des agents pathogènes : deux bactéries, dont un  
20 coque Gram positif (*S. aureus*) et un bacille Gram négatif (*P. aeruginosa*),  
une moisissure sous forme de spores (*A. niger*), et une levure (*C. albicans*),  
l'amplification de l'efficacité destructrice pour un domaine  
particulier ou intervalle de températures particulier. Cet intervalle de  
température recouvrait (aux erreurs d'expériences près) celui de *S. aureus*  
25 (Température égale à  $-6^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ).

[00112] La différence observée à très basse température, c'est-à-dire  
des températures inférieures à  $-5^{\circ}\text{C}$ , est fonction de la sensibilité de  
chacun des micro-organismes vis-à-vis notamment de la pression.

[00113] Tel que démontré dans cet exemple, le procédé de l'invention  
30 via la combinaison particulière des paramètres associés à la valeur de la  
pression (vitesse d'application de la pression, mode d'application de la

pression et température) a un effet synergique sur l'inactivation d'un ensemble de cibles biologiques.

5 **Exemple 9 : exemple d'inactivation d'un agent pathogène sous hautes pressions en fonction de la vitesse d'application de la pression**

[00114] Afin d'évaluer l'apport de la vitesse d'application de la pression dans le phénomène de synergie entre les trois paramètres associés au procédé d'inactivation (vitesse d'application de la pression, mode d'application de la pression et température), du plasma sanguin humain contaminé par *S. aureus* (préparé selon le protocole décrit à l'exemple 6) a été traité dans les conditions suivantes : un mode d'application cyclique de 5 cycles de 2 minutes, une température d'environ -5°C, et une pression de 200 MPa, 250 MPa ou 300 MPa. Pour chacun de ces traitements, deux vitesses d'application de la pression ont été utilisées, à savoir 3,33 MPa.s<sup>-1</sup> et 50 MPa.s<sup>-1</sup>. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 9.

[00115] Les protocoles de mise en œuvre, de préparation et de dénombrement sont identiques à ceux de l'exemple 6.

20 [00116] Les échantillons ont été placés dans un dispositif générateur de hautes pressions en phase liquide par compression directe de type « Framatome » et le milieu transmetteur était le mélange glycol/eau (Kryo 30 Lauda) pour la vitesse de 3,33 MPa.s<sup>-1</sup>. Un équipement générateur de hautes pressions par compression indirecte mis en place en interne avec comme milieu transmetteur l'éthanol a été utilisé pour la vitesse de 50 MPa.s<sup>-1</sup>

[00117] Les résultats présentés dans la figure 9 démontrent bien qu'il faut associer à la fois une vitesse d'application rapide (50 MPa.s<sup>-1</sup>) à un mode d'application cyclique (5 cycles de 2 minutes) et une température négative (environ -5°C) afin d'obtenir l'effet synergique pour que l'inactivation de *S. aureus* soit la plus efficace.

[00118] En particulier à 200 MPa, cet effet de synergie est bien démontré car en utilisant une vitesse d'application de  $3,33 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ , l'efficacité destructrice ED (inactivation du pathogène) du traitement était très faible, voir nulle, alors qu'en utilisant une vitesse d'application de 50 MPa. $\text{s}^{-1}$ , elle est proche de 5.

[00119] En outre, il apparaît que la vitesse d'application de la pression (VA) associée à un mode (MA) cyclique d'application de la pression, 5 cycles de 2 minutes, et à une température de  $-5^{\circ}\text{C}$  joue un rôle primordial dans l'inactivation de *S. aureus*.

[00120] La comparaison entre les résultats observés à la figure 14 de l'exemple 14 ci-dessous et ceux de la figure 9 démontre que les paramètres associés à la pression, le choix particulier de la vitesse d'application de la pression, le mode d'application de la pression et la température conduit à des effets de synergie très surprenants et inexplicables sur l'inactivation de *S. aureus*.

[00121] Le procédé de l'invention permet donc l'inactivation d'agents pathogènes dans le plasma humain avec un effet synergique.

#### **Exemple 10 : exemple de mise en œuvre d'un procédé d'inactivation d'au moins un agent pathogène dans le plasma sanguin humain**

[00122] Afin d'évaluer l'effet de la vitesse d'application de la pression au cours d'un traitement cyclique (5 cycles de 2 minutes) à une température d'environ  $-5^{\circ}\text{C}$  sur la sauvegarde de l'activité des facteurs de coagulation (F VIIIc et F V), deux vitesses d'application ont été testées ( $3,33 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$  et  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ) pour des valeurs croissantes de pression (150 MPa à 250 MPa).

[00123] Les échantillons ont été placés dans un dispositif générateur de hautes pressions en phase liquide par compression directe de type « Framatome » et le milieu transmetteur était le mélange glycol/eau (Kryo 30 Lauda) pour la vitesse de  $3,33 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ . Un équipement générateur de hautes pressions par compression indirecte mis en place en interne avec

comme milieu transmetteur l'éthanol a été utilisé pour la vitesse de 50 MPa.s<sup>-1</sup>

[00124] Les pourcentages d'activité résiduelle (par rapport à l'activité avant la mise en œuvre d'un procédé d'inactivation) des facteurs de coagulation VIIIc et V, à l'issue de la mise en œuvre d'un procédé d'inactivation dans les conditions décrites ci-dessus, sont montrés sur la figure 10.

[00125] L'examen de la figure 10 démontre que la valeur de la vitesse d'application a peu d'influence sur la sauvegarde de l'activité des facteurs VIIIc et V. Il a été montré, dans l'exemple 9, qu'une vitesse d'application rapide (50 MPa.s<sup>-1</sup>) permettait d'augmenter considérablement (effet synergique) l'efficacité destructrice (inactivation) du procédé d'inactivation d'agents pathogènes quand ce paramètre est combiné de façon appropriée à un traitement cyclique (5 cycles de 2 minutes) et une basse température (T = -6°C ± 5°C).

[00126] De plus, il est important de remarquer qu'en choisissant une pression de 200 MPa, une vitesse d'application de la pression de 50 MPa.s<sup>-1</sup>, un cyclage de 5 cycles de 2 minutes et une température de l'ordre de -5°C, la sauvegarde d'activité du facteur VIIIc est supérieure à 70%, et celle du facteur V supérieure à 50%, ce qui répond à la fois aux exigences de la Pharmacopée Européenne (activité des facteurs de coagulation supérieure à 50%) (Ref. 6) mais aussi à celles de la Législation Française (activité des facteurs de coagulation supérieure à 50% sauf pour le facteur VIIIc pour lequel l'activité doit être supérieure à 70%) (Ref. 17).

[00127] Tel que démontré dans cet exemple, la présente invention permet donc d'inactiver au moins un agent pathogène dans le plasma sanguin humain tout en conservant son activité biologique.

**Exemple 11 : inactivation de *Plasmodium berghei* (hématozoaire) et *Trypanosoma brucei brucei* (protozoaire extracellulaire) par mise en œuvre d'un procédé de l'invention**

[00128] Un exemple de procédé d'inactivation d'un agent pathogène selon l'invention a été ensuite testé sur des modèles de parasites susceptibles de contaminer les produits sanguins d'une part *Plasmodium berghei* (hématozoaire) et d'autre part *Trypanosoma brucei brucei* (protozoaire extracellulaire).

[00129] Pour chacun des deux parasites, 10 échantillons de sang de souris (*Mus musculus*) contaminés ont été traités. Les valeurs des paramètres associés à la pression étaient : une vitesse d'application de la pression de 50 MPa.s<sup>-1</sup>, un mode d'application de la pression de 5 cycles de 2 minutes, une température d'environ -5°C, une pression initiale de 0,1 MPa et une pression de 200 MPa.

[00130] Les échantillons ont été placés dans un équipement générateur de hautes pressions par compression indirecte mis en place en interne avec comme milieu transmetteur l'éthanol.

[00131] En parallèle, un échantillon témoin non traité a été conservé ainsi qu'un témoin de température (échantillon équilibré à -15°C pendant 30 minutes). Chaque échantillon a ensuite été observé en microscopie optique puis injecté à une souris. Les conclusions de l'observation microscopique d'une part et les résultats concernant le nombre de souris survivantes un mois après l'injection sont présentés dans le tableau 1 ci-dessous

[00132] tableau 1 : résultats microscopiques et nombre de souris survivantes

|                              | <i>Plasmodium berghei</i> |                    |   | <i>Trypanosoma brucei brucei</i> |                                       |   |
|------------------------------|---------------------------|--------------------|---|----------------------------------|---------------------------------------|---|
|                              | Témoin non contaminé      | Témoin température | Echantillon contaminé traité par le Procédé | Témoin non contaminé             | Témoin température                    | Echantillon contaminé traité par le Procédé |
| Observation microscopique    | Voir la figure 10A        | Parasites vivants  | Voir la figure 10B                          | Parasites nombreux et vivaces    | 50% de parasites vivants, peu vivaces | Pas de parasites                            |
| Nombre de souris survivantes | 0/1                       | 0/1                | 10/10                                       | 0/1                              | 0/1                                   | 10/10                                       |

[00133] Les résultats de l'observation microscopique sont en outre illustrés à la figure 11.

[00134] Tel que démontré dans cet exemple, un exemple de procédé d'inactivation selon l'invention est efficace pour l'inactivation d'une part de *Plasmodium berghei* (hématozoaire) et d'autre part de *Trypanosoma brucei brucei* (protozoaire extracellulaire).

[00135] Tel que démontré dans cet exemple, le procédé de l'invention permet d'inactiver des agents pathogènes tels que des parasites tout en conservant l'activité biologique du plasma sanguin humain.

**Exemple 12 : mise en œuvre d'un exemple de procédé selon l'invention sur la protéine infectieuse du prion présente dans un échantillon de plasma sanguin humain**

[00136] La protéine infectieuse du Prion constitue actuellement l'un des objectifs de la sécurisation de produits biologiques. Le prion de hamster a été choisi comme modèle.

[00137] Du plasma sanguin humain contaminé par du broyat de cerveau de hamster infecté par la protéine infectieuse du prion (263 K) (EFS Pyrénées-Méditerranée) a été utilisé.

[00138] A partir desdits broyats de cerveau de hamster infecté par la souche 263 K (IBH), des échantillons de plasma sanguin humain (1 mL) ont été contaminés puis placés dans des tubulures fermées de manière étanche d'une part et résistant à la pression d'autre part.

[00139] En parallèle des échantillons négatifs (non contaminés) ont été préparés dans les mêmes conditions en ajoutant alors du broyat de cerveau de hamster sain (NBH). Les tubulures ont été placées aussitôt après préparation dans la carboglace.

[00140] Les échantillons ont été traités par paire, une tubulure contenant du plasma contaminé par le broyat de cerveau infecté et une tubulure contenant du plasma contaminé par le broyat de cerveau non

infecté, en utilisant un exemple de procédé d'inactivation d'agent pathogène selon l'invention associant la combinaison appropriée de paramètres associés à la pression c'est à dire une vitesse d'application de la pression de 100 MPa en 2 secondes, soit une vitesse d'augmentation de la pression et de diminution de la pression de 50 MPa.s<sup>-1</sup>, un mode d'application de la pression de 5 cycles de 2 minutes, soit la compression de l'échantillon, le maintien de la pression pendant 120 secondes et la diminution de la pression, la compression étant égale à une pression P<sub>1</sub> de 200 MPa, la température de l'échantillon à la pression P<sub>1</sub> était d'environ - 5°C. Les échantillons ont été placés dans un équipement générateur de hautes pressions par compression indirecte mis en place en interne avec comme milieu transmetteur l'éthanol.

[00141] L'analyse des échantillons a été menée au travers du protocole suivant : extraction de la protéine prion par précipitation au NaPTA 4%, digestion à la protéinase K à 200µg/mL, détection de la PrP<sup>Sc</sup> par Western Blot (l'anticorps utilisé étant l'anticorps 3F4).

[00142] Une comparaison 2 à 2 des signaux obtenus, le prion migrant à environ 27-29 kDa pour les échantillons infectés, a montré une très forte diminution de la quantité de PrP<sup>Sc</sup> pour ceux ayant été soumis à un exemple de procédé selon l'invention par rapport à ceux non traités (Figure 12 comparaison des échantillons traités HPI1 à HPI4 par rapport aux échantillons non traités TI1 à TI4). Ces résultats étaient en outre reproductibles pour les 4 couples d'échantillons infectés (témoin T non traité et échantillon traité par le procédé de l'invention). Il apparaît donc clairement que la protéine infectieuse PrP<sup>Sc</sup> a été modifiée par la mise en œuvre d'un exemple de procédé selon l'invention ; ce qui suggère une répercussion négative quant à son pouvoir infectieux.

**Exemple 13 : Evaluation de la valeur de la pression sur l'inactivation d'un agent pathogène (*S. aureus*) au sein d'un échantillon de plasma sanguin humain par un traitement sous hautes pressions pendant 10**

**minutes en continu à température ambiante (25°C) et avec une vitesse d'application de la pression (VA) relativement modérée et conventionnelle (3.33 MPa. s<sup>-1</sup>).**

5 [00143] *Staphylococcus aureus* est un agent pathogène bien identifié et provoque de nombreuses maladies nosocomiales. Cet agent pathogène a été choisi comme modèle dans cet exemple.

[00144] Les protocoles de mise en œuvre, de préparation et de dénombrement sont identiques à ceux de l'exemple 6.

10 [00145] Les échantillons ont été placés dans un équipement générateur de hautes pressions par compression indirecte mis en place en interne avec comme milieu transmetteur l'éthylène glycol associé avec de l'eau Kryo 30 lauda (60% monoéthylène glycol et 40% d'eau).

[00146] La température a été maintenue à 25°C. La vitesse  
15 d'application de la pression (VA) était de 3.33 MPa. s<sup>-1</sup> La durée de traitement était de 10 minutes en maintenant la valeur constante de la pression. Plusieurs valeurs de la pression ont été utilisées afin d'évaluer l'impact sur l'inactivation de l'agent pathogène *S. aureus* à 200 MPa, 250 MPa, 300 MPa, 400 MPa.

20 [00147] La figure 13 représente les valeurs de l'efficacité destructrice (ED) observées pour chacune de ces pressions.

[00148] Les résultats obtenus montrent que la pression, au moins jusqu'à 400 MPa, a peu d'effet sur l'inactivation de *S. aureus* du fait des valeurs relativement faibles de l'efficacité destructrice (ED).

25

**Exemple 14: Evaluation de l'inactivation d'un agent pathogène (*S. aureus*) dans un échantillon de plasma sanguin au travers d'un traitement sous hautes pressions à température ambiante (25°C), un mode d'application de la pression continu, une durée de 10 min avec  
30 différentes vitesses d'application VA de la pression**

[00149] Dans l'exemple 13 ci-dessus, le mode d'application de la pression MA était continu et la vitesse d'application de la pression était relativement « conventionnelle » (soit  $3,33 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ). La durée de traitement était de 10 minutes et la température de traitement était de 5 25°C.

[00150] Le but de cet exemple est d'avoir une évaluation de l'effet de la vitesse d'application (VA) de la pression sur l'inactivation de *S. aureus*, les valeurs des autres paramètres demeurant constantes : un mode d'application MA continu de la pression, une température de traitement de 10 25°C et une durée de traitement de 10 minutes.

[00151] Afin d'avoir une évaluation de l'impact de la vitesse d'application VA sur l'inactivation de *S. aureus*, deux vitesses très différentes d'application de la pression ont été choisies : une vitesse conventionnelle  $3,33 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$  et une vitesse rapide  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ .

[00152] Les valeurs de la pression étaient de 200 MPa, 250 MPa et 300 MPa. Des valeurs plus élevées n'ont pas été sélectionnées, l'activité biologique du plasma sanguin humain étant fortement altérée au-delà de 15 300 MPa.

[00153] Les protocoles de mise en œuvre, de préparation et de dénombrement sont identiques à ceux de l'exemple 6. 20

[00154] La figure 14 représente l'efficacité destructrice ED vis-à-vis de *S. aureus* selon la valeur de la pression pour différentes valeurs de la vitesse d'application de la pression VA.

[00155] L'analyse des résultats illustrés à la figure 14 montre, qu'aux 25 erreurs d'expériences près, on n'observe aucun effet de la vitesse d'application VA de la pression sur la valeur de l'efficacité destructrice de *S. aureus*. En effet, l'efficacité destructrice quelle que soit la pression et/ou la vitesse est inférieure à 1.

[00156] Ce résultat laisse à penser que la vitesse d'application de la 30 pression n'est pas un paramètre susceptible de jouer un rôle important dans l'inactivation d'un agent pathogène tel que *S. aureus*, d'où

l'importance des paramètres associés à la pression puisqu'il a été montré que la VA était un facteur primordial quand un MA cyclique et des températures négatives (-5°C) étaient utilisés (cf. exemple 9).

5 **Exemple 15 : Evaluation de l'inactivation d'un agent pathogène (*S. aureus*) au sein d'un échantillon de plasma sanguin humain au travers d'un traitement sous hautes pressions à température ambiante (25°C), avec une vitesse d'application de la pression VA 3.33 MPa. s<sup>-1</sup> en fonction du mode d'application de la pression (MA),**  
10 **continu (10 min.), ou cyclique ( 5 cycles de 2 min. ou 20 cycles de 30 secondes)**

[00157] Dans l'exemple 13, seul un mode d'application continu a été appliqué. Dans cet exemple, l'objectif était d'évaluer le rôle du mode d'application de la pression (MA), pour des valeurs de la pression de 200  
15 MPa, 250 MPa et 300 MPa – l'activité biologique du plasma étant fortement altérée au-delà de 300 MPa. Les autres paramètres ont été maintenus constants : vitesse d'application de 3,33 MPa.s<sup>-1</sup> et température de traitement de 25°C.

[00158] Les protocoles de mise en œuvre, de préparation et de  
20 dénombrement sont identiques à ceux de l'exemple 6.

[00159] La figure 15 est un histogramme représentant l'efficacité destructrice (ED) (ordonnée) en fonction de la pression (abscisse). La vitesse d'application de la pression était de 3.33 MPa.s<sup>-1</sup>. Le mode d'application de la pression était de 5 cycles de 2 minutes (bâtons hachurés), de 20 cycles de 30 secondes (bâtons vides) ou d'un cycle de  
25 10 minutes (bâtons pleins).

[00160] L'analyse de la figure 15 montre que le mode d'application de la pression soit de manière continue soit de manière cyclique n'a pas d'effet (aux erreurs d'expériences près) sur la valeur de l'efficacité destructrice  
30 (ED) de *S. aureus* tant à 200 MPa qu'à 250 MPa. Pour la valeur de la pression de 300 MPa, on observe une légère augmentation de la valeur de

l'efficacité destructrice pour un mode d'application cyclique. Cependant il faut noter que l'amélioration apportée, de l'ordre de 1,5, n'est pas significative.

5 [00161] Cet exemple démontre donc clairement que le mode d'application de la pression ne permet pas d'atteindre des valeurs importantes de l'inactivation d'un agent pathogène tel que *S. aureus*.

**Exemple 16: Evaluation de l'inactivation d'un agent pathogène (*S. aureus*) au sein d'un échantillon de plasma humain par un traitement sous hautes pressions avec un mode d'application de la pression MA continu, une durée de 10 min. une vitesse d'application VA de 3,33 MPa.s<sup>-1</sup> en fonction du température de traitement : 25°C et -5°C.**

10 [00162] Dans l'exemple 13, le mode d'application de la pression MA était continu et la vitesse d'application de la pression était relativement « conventionnelle », c'est-à-dire égale à 3,33 MPa.s<sup>-1</sup>. La durée de traitement était de 10 minutes et la température de traitement était de 25°C.

15 [00163] L'objectif de cet exemple est d'évaluer l'impact de la température de traitement sur l'inactivation de *S. aureus*.

20 [00164] Deux températures de traitement ont été sélectionnées : d'une part +25°C comme dans l'exemple 13 et d'autre part une température négative : -5°C.

[00165] Les autres valeurs des paramètres ont été maintenues constantes et égales à celles utilisées dans l'exemple 13 soit MA continu, durée de traitement de 10 minutes et une vitesse d'application (VA) de 3,33 MPa.s<sup>-1</sup>.

25 [00166] Les protocoles de mise en œuvre, de préparation et de dénombrement sont identiques à ceux de l'exemple 6.

[00167] Les résultats obtenus sont donnés à la figure 16. La figure 30 16 est un histogramme représentant l'efficacité destructrice (ED)

(ordonnée) en fonction de la pression (abscisse). La température était de -5°C (bâtons hachurés) ou de 25°C (bâtons pleins)

[00168] L'analyse de la figure 16 montre un net accroissement de l'inactivation de *S. aureus* lorsque la température de traitement passe de +25°C à celle négative de -5°C (bâtons hachurés). Il apparaît cependant que cet effet soit plafonné lorsque la pression augmente de 250 MPa à 300 MPa, aucun accroissement de la valeur de l'efficacité destructrice n'étant observé entre ces deux valeurs de la pression.

#### 10 **Exemple 17 : Etude de l'effet de synergie d'inactivation d'agents pathogènes autres que *S aureus***

[00169] Les mêmes valeurs des paramètres que ceux utilisés à l'exemple 6, soit une pression de 200 MPa, un mode d'application cyclique de la pression MA de 5 cycles de 2 minutes et une vitesse d'application de la pression VA de 50 MPa.s<sup>-1</sup> ont été mises en œuvre.

[00170] Le domaine de température exploré était compris entre -15°C et +30°C.

[00171] Les 5 micro-organismes de la Pharmacopée européenne ont été choisis comme agents pathogènes [*S. aureus* (ATCC 6538), *P. aeruginosa* (ATCC 9027), *C. albicans* (ATCC10231), *A. niger* (ATCC 16404), *B. subtilis* à l'état végétatif (ATCC 9372)].

[00172] Les méthodes de préparation et de dénombrement des échantillons de plasma contaminé par *S. aureus* et *P. aeruginosa* étaient identiques à celles décrites dans l'exemple 6, à l'exception du milieu de culture pour *C. albicans* et *A. niger*, pour lesquels la gélose utilisée est la gélose Sabouraud (AES Chemunex)

[00173] Dans le cas de *B. subtilis* la méthode de préparation consistait à repiquer la souche ATCC 9372 dans un bouillon cœur-cerveau mis à incuber 24h à 35°C. Cette culture est ensuite centrifugée à 12 000 g pendant 4 min et le culot est remis en suspension dans 10 mL de bouillon

TS. Cette suspension a ensuite servi à contaminer 300 mL de plasma sanguin humain

[00174] Les résultats observés sont donnés à la figure 17. La figure 17 est un diagramme représentant l'efficacité destructrice vis-à-vis de *S. aureus*, de *P. aeruginosa*, de *A. niger*, de *C. albicans* et de *B. subtilis* (ordonnée) en fonction de la température (abscisse).

[00175] De manière tout à fait surprenante, il apparaît que, quelle que soit la nature du micro-organisme étudié (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *A. niger*, *B. subtilis*), on observe un effet d'amplification de l'efficacité destructrice dans un certain domaine de températures.

[00176] De façon inattendue, les domaines de températures où cette amplification de l'inactivation pour l'ensemble des 5 micro-organismes de la Pharmacopée européenne est observée se recouvrent. Ainsi, on peut donc définir un domaine commun de températures où l'ensemble des micro-organismes pathogènes est inactivé.

[00177] Cet exemple démontre donc clairement qu'un exemple de procédé de l'invention permet d'inactiver l'ensemble des 5 microorganismes de la pharmacopée européenne avec un effet synergique de par le choix particulier de la pression, de la vitesse de compression et détente et le mode d'application (MA) de la pression, par exemple une pression de 200 MPa, une vitesse  $VA = 50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ , un mode d'application de la pression de 5 cycles de 2 minutes et une température (T) comprise de  $-10^{\circ}\text{C}$  à  $-3^{\circ}\text{C}$ .

[00178] En outre, cet exemple démontre clairement qu'un exemple de procédé de l'invention permet d'inactiver l'ensemble des agents pathogènes présents dans un échantillon de plasma.

**Exemple 18 : Evaluation de l'activité biologique du plasma sanguin humain en appliquant les valeurs des paramètres caractérisant un exemple de procédé d'inactivation des agents pathogènes de l'exemple 17**

[00179] Un procédé de traitement du plasma sanguin humain avec une pression de  $P=150$  MPa, 200 MPa, 250 MPa et 300 MPa, une vitesse d'application de  $VA= 50$  MPa.s<sup>-1</sup>, un mode d'application  $MA= 5$  cycles de 2 minutes et  $-10^{\circ}\text{C}<T<-3^{\circ}\text{C}$  a été appliqué à du plasma sanguin humain.

5 [00180] Une valeur médiane de la température ( $-5^{\circ}\text{C}$ ) a été choisie pour cette évaluation.

[00181] Des échantillons de 4 mL environ de plasma sanguin humain frais ont été prélevés et placés dans des tubes étanches, puis mis à congeler à  $-30^{\circ}\text{C}$  dans l'attente d'être traités sous hautes pressions.

10 [00182] L'activité résiduelle des facteurs de coagulation VIIIc et V a été déterminée par la méthode du temps de céphaline avec activateur décrite dans l'exemple 1.

[00183] Les activités résiduelles des protéines supports des facteurs de coagulation VIIIc et V sont donnés à la figure générale 18. - Les figures  
15 18 A et B sont des histogrammes représentant le pourcentage d'activité de protéines plasmatiques (%act) (ordonnée) en fonction de la pression (P) en Méga Pascal (MPa) (abscisse).

[00184] L'analyse de la figure 18 montre qu'à 200 MPa on observe une activité relative du Facteur VIIIc d'environ 75 % et celle du Facteur V  
20 d'environ 58%. Ces valeurs sont supérieures à celles requises par la Législation européenne (50% pour le facteur VIIIc et pour le Facteur V) et la Législation française (70% pour le Facteur VIIIc et 50% pour le Facteur V).

[00185] Ainsi, un exemple de procédé de l'invention permet d'obtenir  
25 une efficacité destructrice importante de l'agent pathogène le plus baro-résistant : *S aureus*, c'est-à-dire une efficacité destructrice de l'ordre de 5 tout en maintenant l'activité biologique des Facteurs VIIIc et V.

[00186] En d'autres termes, un exemple de procédé de l'invention permet d'obtenir à la fois une synergie d'inactivation des agents  
30 pathogènes présents dans le plasma sanguin humain tout en conservant l'activité biologique des protéines présentes dans le plasma sanguin.

**Exemple 19 : Evaluation de l'irréversibilité de l'inactivation d'un agent pathogène au travers du « Procédé de sécurisation d'au moins un agent pathogène dans un échantillon de plasma sanguin » dans un échantillon de plasma sanguin humain.**

[00187] L'agent pathogène choisi était *S. aureus* (ATCC 6538) du fait de sa forte résistance aux effets de pression (appelée encore barorésistance).

[00188] Une suspension de *S. aureus* dans le plasma sanguin a été préparée selon le procédé décrit à l'exemple 6 de façon à obtenir un titrage de l'ordre de  $N= 1 \cdot 10^5$  UFC /mL.

[00189] Cette suspension a servi à préparer d'une part un tube N°1 d'un volume de 4 mL servant de témoin et d'autre part un tube N°2 d'un volume également de 4 mL destiné à être soumis à un traitement comprenant l'application d'une pression de 200MPa, à une vitesse de 50 MPa.s<sup>-1</sup>, selon un mode d'application de 5 cycles de 2 minutes à une température de -5°C (condition d'un exemple de procédé de l'invention).

[00190] Les tubes N°1 et N°2 ont été gardés au congélateur pendant 14 jours.

[00191] Ensuite les contenus de ces 2 tubes ont servi àensemencer des bouillons de culture cœur-cervelle.

[00192] Après 48 heures d'incubation à 35 °C, si on observe une reprise de croissance importante pour le milieu de cultureensemencé par le tube témoin N°1 –non traité par un exemple de Procédé de l'invention, en revanche aucune reprise de croissance n'a pu être décelée pour le milieu de cultureensemencé par le tube N°2 traité selon les conditions d'un exemple de Procédé de l'invention.

[00193] Une autre observation a été menée au bout de 7 jours. Pour le milieu de cultureensemencé par le tube N°2 traité par un exemple de Procédé de l'invention, elle n'a toujours pas permis de mettre en évidence une reprise de croissance.

[00194] Compte tenu des valeurs nutritives du bouillon cœur-cerveille, bien connues de l'Homme de l'art, l'absence de croissance au bout d'un temps d'incubation relativement long de 7 jours démontre que l'inactivation d'un agent pathogène selon le Procédé tel que *S. aureus*, considéré  
5 comme très barorésistant, est irréversible.

[00195] Comme démontré dans cet exemple, un exemple de procédé de l'invention permet donc une inactivation irréversible d'agents pathogènes tels que *S. aureus*.

10 **Exemple 20 : inactivation de souches de *S. aureus* multi-résistantes aux antibiotiques par mise en œuvre d'un exemple de procédé de l'invention.**

[00196] L'inactivation par un exemple de procédé de l'invention de deux souches de *S. aureus* présentant de multiples résistances aux  
15 antibiotiques : ATBR1 (P<sup>+</sup>) et ATBR2 (P<sup>-</sup>) a été testée et comparée à la souche de référence de *S. aureus* (ATCC 6358).

[00197] Les protocoles mis en œuvre lors des tests relatifs aux deux souches ATBR1 (P<sup>+</sup>) et ATBR2 (P<sup>-</sup>) sont identiques à ceux décrits dans l'exemple 6.

20 [00198] Le tableau ci-dessous donne les valeurs de l'efficacité destructrice (ED) observées pour les 3 souches : ATBR1 (P<sup>+</sup>) et ATBR2 (P<sup>-</sup>) et celle de référence (ATCC 6358) après traitement selon les conditions de pression, de vitesse d'application, de mode d'application et de température décrites dans l'exemple 19 (VA= 50 MPa.s<sup>-1</sup>, MA= 5 cycles  
25 de 2 minutes, T= - 5°C, P= 200 MPa).

[00199] Le tableau 2 ci-dessous représente les résultats de l'efficacité destructrice (ED) obtenue en fonction des souches testées.

|    | ATCC 6538<br>Souche<br>« de<br>référence » | ATBR <sub>1</sub> (P <sup>+</sup> ) | ATBR <sub>2</sub> (P <sup>-</sup> ) |
|----|--|-------------------------------------|-------------------------------------|
| ED | ≈ 4,9                                      | ≈ 4                                 | ≈ 6,2                               |

[00200] Il apparaît que pour les souches de *S. aureus* la résistance aux antibiotiques d'une part et le comportement vis-à-vis d'un exemple du procédé de l'invention d'autre part ne sont pas comparables.

5 [00201] En effet la souche particulièrement résistante aux antibiotiques ATBR2 (P<sup>-</sup>) apparaît très sensible aux effets d'un exemple de procédé de l'invention (ED de l'ordre de 6,2) et la valeur de l'efficacité destructrice est même supérieure à celle observée dans les mêmes conditions pour la souche de référence (ATCC 6358).

10 [00202] On remarque également que quelle que soit la souche de *S. aureus* particulièrement résistante aux antibiotiques [ATBR1 (P<sup>+</sup>) et ATBR2 (P<sup>-</sup>)], on observe – après application d'un exemple de procédé de l'invention une valeur importante de l'efficacité destructrice.

15 **Exemple 21 : inactivation du virus de la rougeole pris comme virus contaminant du plasma sanguin humain par un exemple de procédé de l'invention.**

[00203] Cet exemple a pour objectif d'évaluer l'efficacité d'un exemple de procédé de l'invention vis-à-vis d'un virus.

20 [00204] Dans une première étape, les inventeurs ont sélectionné comme virus celui de la rougeole.

[00205] L'infectivité du virus de la rougeole avant et après traitement par un exemple de Procédé de l'invention a été évalué en infectant des cellules vero (S. ROZENBLATT, T. KOCH, O. PINHASI, S. BRATOSIN ,  
25 "*Infective substructures od Measles virus from Acutely and Persistently Infected Cells*", J. of Virology (1979),32, p. 329-333 (Réf 21)).

[00206] Le protocole mis en œuvre pour l'évaluation de l'infectivité est décrit dans R. RUSTIGIAN « *Persistent Infection of Cells in Culture by Measles Virus, I. Development and Characteristics of HeLa Sublines Persistently Infected with Complete Virus* », J. of Bacteriology (1966), 92,  
30 p.1792-1804 (Réf 22).

[00207] Le titre viral initial était d'environ  $2 \cdot 10^3$  unités/mL.

[00208] Cette suspension virale a ensuite été répartie en deux tubes : le tube N°1 qui a servi de témoin non traité par le Procédé et le tube N°2 qui a subi les conditions suivantes : pression  $P=200$  MPa, vitesse de compression détente  $VA= 50$  MPa.s<sup>-1</sup>, mode d'application de la pression MA= 5 cycles de 2 minutes et température  $T=-5^{\circ}\text{C}$ .

[00209] Après ce traitement le titre viral a été évalué dans le tube N°2 et comparé à celui du tube N°1 pris comme témoin (Tableau ci dessous).

[00210] Tableau 3 : titre du virus avant application d'un exemple de procédé de l'invention (avant HP) ou après application d'un exemple de procédé de l'invention (après HP)

|          | Titre (Unités.mL <sup>-1</sup> ) |
|----------|----------------------------------|
| Avant HP | $2 \times 10^3$                  |
| Après HP | $\approx 0$                      |

[00211] Comme démontré dans cet exemple, un exemple de procédé de l'invention permet d'inactiver dans le plasma sanguin humain le virus de la rougeole.

**Exemple 22 : inactivation du Virus de l'immunodéficience humaine (VIH) pris comme virus contaminant du plasma sanguin humain par un exemple de procédé de l'invention**

[00212] Le VIH est un rétrovirus qui infecte les lymphocytes T CD4+. Au début de l'infection, il se fixe sur ces récepteurs, puis fusionne avec la membrane de la cellule hôte. Ses deux brins d'ARN sont alors rétrotranscrits en ADN double brin grâce à sa transcriptase inverse. L'intégrase permet ensuite à cet ADN de s'intégrer dans le génome de la cellule hôte.

**A. Principe du test de détection du VIH**

[00213] L'inactivation du VIH par un exemple de procédé de l'invention a été évaluée par le test au 4-MUG décrit dans le document

V.R. De SOULTRAIT, A. CAUMONT, V. PARISSI, N. MORELLET, M. VENTURA, C. LENOIR, S. LITVAK, M. FOURNIER, B. ROQUES « A novel short peptide is a specific inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 integrase » J. Mol. Biol. (2002), 318, p.45-58 (Réf 23). Ce test est basé sur l'expression de la protéine virale Tat, qui est un activateur de transcription des gènes du VIH-1. Pour ce test, l'infection est réalisée sur des cellules HeLa P4, qui possèdent un gène rapporteur Lac Z dont l'expression est sous le contrôle d'un promoteur activé par la protéine Tat. Ainsi, si le VIH n'est pas inactivé, il va pénétrer dans ces cellules, s'intégrer dans le génome, exprimer la protéine Tat qui va alors activer la transcription du gène Lac Z. Ceci conduit à la synthèse de  $\beta$ -galactosidase, qui catalyse la dégradation du 4-MUG en un produit fluorescent. L'intensité de la fluorescence est alors mesurée et est proportionnelle à l'infektivité virale.

[00214] Les expériences ont été réalisées directement sur des surnageants viraux préparés par co-culture de cellules MT<sub>4</sub> et H<sub>9</sub> Lai selon le protocole décrit dans P. CHARNEAU, G. MIRAMBEAU, P. ROUX, S. PAULOUS, H. BUC, F. CLAVEL , « HIV-1 Reverse Transcription – A termination step at the center of the genome », J. Mol. Biol. (1994), 241, p. 651-662 (Réf 24).

[00215] Un premier échantillon a été soumis à un exemple de procédé de l'invention, à savoir une pression de 200 MPa, une vitesse d'application de 50 MPa.s<sup>-1</sup>, un mode d'application de la pression de 5 cycles de 2 minutes et une température de -5°C tandis que le second a été placé dans le bain réfrigéré dans lequel plongeait l'enceinte d'expérience (« témoin de température »). A la fin de ces traitements, les surnageants viraux ont été récupérés pour infecter des plaques 96 puits dans lesquels ont été cultivées des cellules HeLa P4 selon le protocole décrit dans P. CHARNEAU, G. MIRAMBEAU, P. ROUX, S. PAULOUS, H. BUC, F. CLAVEL , « HIV-1 Reverse Transcription – A termination step at the center of the genome », J. Mol. Biol. (1994), 241, p. 651-662 (Réf 24).

[00216] Après la première infection, les plaques ont été incubées pendant 72 h à 37°C et 5 % CO<sub>2</sub>, puis elles ont été révélées par la méthode du 4-MUG. En parallèle, les surnageants viraux ont été récupérés pour infecter une nouvelle plaque 96 puits, qui a été placée à l'étuve pendant 2 heures, le temps que les virus éventuellement présents puissent infecter les cellules. Le volume de surnageants viraux était de 100 µL. Elle a ensuite été lavée avec une solution de PBS 1X afin d'éliminer tous les éléments qui auraient pu être transportés avec les surnageants viraux, puis remise à l'étuve pendant 72 h. Une révélation au 4-MUG a alors été réalisée.

## B Résultats

[00217] Les résultats ont été obtenus par le procédé décrit dans V.R. De SOULTRAIT, A. CAUMONT, V. PARISSI, N. MORELLET, M. VENTURA, C. LENOIR, S. LITVAK, M. FOURNIER, B. ROQUES « A novel short peptide is a specific inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 integrase » J. Mol. Biol. (2002), 318, p.45-58 (Réf 23).

[00218] Pour chaque plaque, la moyenne des intensités de fluorescence mesurées dans les puits contenant les cellules non infectées (bruit de fond) a été soustraite aux valeurs détectées dans chaque autre puits. Les résultats obtenus après 72 h d'incubation sont présentés dans la figure 19. La figure 19 représente l'intensité de la fluorescence (ordonnée) en fonction du facteur de dilution (abscisse). Les croix correspondent aux résultats obtenus avec (HP), les carrés noirs aux résultats obtenus avec un témoin « T ».

[00219] Les résultats reportés dans la figure 19 montrent une diminution du signal détecté dans les puits ayant été infectés par les surnageants viraux soumis à un exemple de procédé de l'invention par rapport à ceux ayant reçu les surnageants viraux du « témoin de température ». Il y a donc eu une inactivation du VIH-1 par un exemple de procédé de l'invention.

[00220] Les surnageants viraux de cette plaque ont tout de même été récupérés afin d'infecter de nouvelles cellules. Le procédé d'infection est identique au procédé d'infection précité. Les résultats observés 72 h après cette réinfection sont reportés dans la figure 20.

5 [00221] Les résultats de la réinfection (figure 20) révèlent qu'aucun signal n'a pu être détecté dans les puits ayant reçu les échantillons soumis à la pression. Ainsi, cet exemple démontre que l'ensemble de la population virale initiale a été inactivé par un exemple de procédé de l'invention.

10 **Exemple 22 : inactivation de divers parasites par un exemple de procédé de l'invention.**

[00222] Les parasites sanguicoles posent un problème pour les transfusions et injections de produits dérivés du sang. En effet, des parasitoses post-injection de ces produits ont été reportées, notamment le  
15 paludisme, plus exceptionnellement la leishmaniose, et en Amérique du Sud, la maladie de Chagas.

[00223] Pour *P. berghei*, *T.b.b.* et *T. Feo*, l'ensemble des expériences a consisté à prélever du sang à des souris contaminées par le parasite à tester. Pour *T. cruzi* et *L. donovani*, les parasites ont été préparés par  
20 culture cellulaire dans du milieu LIT (Liver Infusion Tryptose) pour *T. cruzi* et RPMI 1640 plus SVF pour *L. donovani*.

[00224] Les échantillons ont ensuite été séparés en quatre lots :

- le premier échantillon correspondait au « témoin non traité »,
- le deuxième consistait en un « témoin de transport », c'est-à-dire  
25 qu'il a suivi le même parcours que les échantillons traités mais est resté toute la journée à température ambiante,
- le troisième, le « témoin de température », a été plongé dans le bain réfrigéré dans lequel était placée l'enceinte hautes pressions afin d'évaluer l'effet de la congélation seule sur les parasites,
- 30 - le dernier lot a été traité sous hautes pressions, en utilisant les paramètres suivant pression  $P = 200$  MPa, vitesse d'application et

de détente  $VA = 50 \text{ MPa.s}^{-1}$ , mode d'application de la pression  $MA = 5$  cycles de 2min, température  $T \approx -5^\circ\text{C}$ .

[00225] Chacun des échantillons : témoin ou ayant subi le traitement hautes pressions, a été observé par microscopie optique. Le microscope  
5 utilisé était un OLYMPUS CA20. Pour *P. berghei*, *T.b.b.* et *T. Feo*, les échantillons ont ensuite été injectés à des souris saines. Le nombre de souris survivantes un mois après l'injection a ensuite permis de conclure sur l'effet inactivant de l'application de ce traitement. Pour *T. cruzi* et *L. donovani*, les échantillons ont été remis au contact de milieux de culture  
10 précisés ci-dessus et ont été placés à l'incubateur pendant 5 semaines à  $35^\circ\text{C}$  pour *T. cruzi* et à  $28^\circ\text{C}$  sans  $\text{CO}_2$  pour *L. donovani* afin d'observer une éventuelle multiplication des parasites. Le volume des échantillons était de 1 mL de suspension de parasites traités sous hautes pressions pour 9 mL de milieu de culture.

15 [00226] Les témoins « transport » correspondent aux échantillons ayant suivi les mêmes conditions expérimentales à l'exception du traitement par un exemple de procédé de l'invention et est resté toute la journée à température ambiante.

[00227] les témoins « température » correspondent aux échantillons  
20 ayant été plongés dans le bain réfrigéré dans lequel était placée l'enceinte hautes pressions afin d'évaluer l'effet de la congélation seule sur les parasites

[00228] Le Tableau 4 ci-dessous résume les résultats obtenus

|                                  | Témoïn non traité            | Témoïn « transport »          | Témoïn « Température »                           | Echantillons traités sous HP |
|----------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--|------------------------------|
| <i>Plasmodium berghei</i>        | Observation microscopique    | Parasites nombreux et vivaces | Parasites moins vivaces que le témoïn non traité | <u>Pas de parasites</u>      |
|                                  | Nombre de souris survivantes | 0/1                           | 0/1  | 10/10                        |
| <i>Trypanosoma brucei brucei</i> | Observation microscopique    | Parasites nombreux et vivaces | Parasites moins vivaces que le témoïn non traité | <u>Pas de parasites</u>      |
|                                  | Nombre de souris survivantes | 0/1                           | 0/1  | 10/10                        |
| <i>Trypanosoma cruzi</i>         | Observation microscopique    | Parasites nombreux et vivaces | Parasites nombreux et vivaces                    | <u>Pas de parasites</u>      |
|                                  | Culture cellulaire           | Multiplication des parasites  | Multiplication des parasites                     | Absence de parasites         |
| <i>Trypanosoma FEO</i>           | Observation microscopique    | Parasites nombreux et vivaces |  | <u>Pas de parasites</u>      |
|                                  | Nombre de souris survivantes | 0/1                           | 0/1  | 6/8                          |
| <i>Leishmania donovani</i>       | Observation microscopique    | Parasites nombreux et vivaces | Parasites nombreux et vivaces                    | <u>Pas de parasites</u>      |
|                                  | Culture cellulaire           | Multiplication des parasites  | Multiplication des parasites                     | Absence de parasites         |

[00229] Tel que démontré dans cet exemple, un exemple de procédé objet de la présente invention permet d'inactiver la totalité des parasites testés.

5

**Exemple 23 : Evaluation de la non-toxicité du plasma traité par un exemple de procédé de l'invention**

[00230] L'objectif de la présente invention est de vérifier que le plasma ayant été soumis à un procédé objet de l'invention n'est pas immunogène.

10

[00231] Dans cet exemple, des monocytes ont été mis en présence de plasma traité selon un exemple de procédé de l'invention. Une vérification que le plasma traité n'induit pas la formation de cellules dendritiques (DC), cellules impliquées dans la présentation de l'antigène au cours de la réponse immunitaire a été alors effectuée.

15

[00232] Des monocytes ont été préparés à partir d'une poche de sang total selon le procédé décrit ci après.

20

[00233] Le sang a été réparti dans des tubes Falcon (marque déposée) à raison de 50 mL par tube puis les tubes ont été centrifugés pendant 15 min à 900 tours par minutes sans frein. Le plasma a été ensuite éliminé et le culot est repris dans du PBS (qsp 50 mL). Après homogénéisation, les tubes ont été à nouveau centrifugés 15 min à 2500 tours par minutes sans frein. Le « buffy coat » présent entre les couches « plasma-PBS » et « globules rouges » est prélevé puis complété avec du RPMI (qsp 35 mL). Après homogénéisation, cette suspension a été versée très doucement dans un tube contenant 15 mL de Ficoll. Les tubes ont été centrifugés pendant 20 min à 2000 rpm sans frein. Le sérum a été ensuite aspiré puis l'anneau laiteux contenant les monocytes a été prélevé et transféré dans un nouveau tube Falcon. Les tubes ont été complétés avec du milieu RPMI + L-Glutamine + SVF 8% (qsp 50 mL) puis centrifugés

25  
30

pendant 10 min à 1500 tours par minutes. Les surnageants ont été éliminés et les culots ont été repris dans 5 mL de milieu avant d'être regroupés dans un seul tube Falcon, qui a été complété jusqu'à 50 mL avec du milieu. Après centrifugation pendant 10 min à 900 tours par minutes, les surnageants ont été éliminés, et les culots ont été repris dans 20 mL de milieu. Les cellules ont été comptées en cellule de Malassez afin de déterminer la concentration. Après centrifugation à 1500 tours par minutes pendant 10 min, les culots ont été remis en suspension dans un volume de milieu défini de façon à avoir une concentration de monocytes d'environ  $4.10^6$  cellules/mL.

[00234] Ces monocytes ont été ensuite répartis en plaques 6 puits à une concentration de  $4.10^6$  cellules/mL (2mL/puits). Les plaques ont été mises à incuber pendant 2 h afin que les monocytes adhèrent au fond des puits. Le milieu de culture des monocytes comprenant du RPMI (commercialisé par la société Sigma), du Sérum de Veau Fœtal (SVF) et de la pénicilline a été ensuite remplacé par :

- soit du milieu de culture seul (témoin négatif : *Mono*),
- soit du milieu de culture additionné de 25 ng de facteur de stimulation de la croissance des granulocytes-macrophage (« Granulocyte-macrophage colony stimulating factor » (GMSCF)) et 10 ng d'interleukine 4 (IL4) (cocktail nécessaire pour la génération de DC : témoin positif : *GMIL4*),
- soit du milieu de culture additionné de 10% de plasma non soumis au procédé (témoin non traité : *Tém*),
- soit du milieu de culture additionné de 10% de plasma soumis au procédé (échantillon HP : *HP*).

[00235] Les plaques ont été ensuite mises à incuber pendant 3 à 5 jours à  $37^{\circ}\text{C}$  / 5%  $\text{CO}_2$ . Les surnageants contenant les cellules dendritiques (DC) ont été récupérées et centrifugées. Après lavage avec du tampon phosphate salin (« Phosphate Buffer Salin » (PBS)) des culots

contenant les cellules, ces derniers ont été remis en suspension dans du tampon phosphate salin (« Phosphate Buffer Salin » (PBS)). Les suspensions ainsi préparées ont été divisées et mises en présence de marqueurs couplés à un fluorochrome. Ces marqueurs sont généralement des IgG capables de se fixer spécifiquement à des marqueurs exprimés à la surface des cellules. Les marqueurs suivants ont été sélectionnés :

- CD14 : exprimé à la surface des monocytes mais pas des DC,
- CD40 et HLA-Dr : sur-exprimé à la surface des DC,
- CD80 : exprimé à la surface des DC matures.

10 [00236] Après incubation pendant 15 min à température ambiante et dans le noir, les suspensions sont centrifugées, les culots contenant les cellules sont lavés avant d'être remis en suspension dans 200 µL de PBS. La lecture a été ensuite réalisée en cytométrie de flux avec le dispositif BD FACS Diva.

15 [00237] Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 21.

[00238] Une population de cellules P1 a été définie en fonction de la taille des cellules attendues (**SSC** : Sideways Scatter Channel – signal corrélé à la complexité cellulaire, **FSC** : Forward Scatter Channel – signal corrélé à la taille relative des cellules). Les données prises en compte étaient les suivantes :

- **#Events** : nombre total d'événements (cellules) dans la population définie,
- **%Parent** : nombre d'événements dans la population définie divisé par le nombre total d'événements, exprimé en pourcentage,
- 25 - **Mean** : valeur moyenne (dans ce cas de l'intensité de fluorescence) pour les événements de la population définie.

[00239] Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 5 ci-dessous :

| Echantillon | Marquage     | #Events | %Parent | Valeur moyenne de l'intensité de fluorescence |       |      |      |
|-------------|--------------|---------|---------|---|-------|------|------|
|             |              |         |         | CD14  | CD40  | CD80 | Dr   |
| GMIL4       | CD14<br>CD40 | 5051    | 50,5    | 137   | 25182 |      |      |
|             | CD14<br>CD80 | 5315    | 53,2    | 207   |       | 776  |      |
|             | CD14 Dr      | 4680    | 46,8    | 252   |       |      | 2016 |
| Mono        | CD14<br>CD40 | 901     | 9,0     | 4074  | 1017  |      |      |
|             | CD14<br>CD80 | 1521    | 15,2    | 5214  |       | 525  |      |
|             | CD14 Dr      | 1441    | 14,4    | 4392  |       |      | 9762 |
| Tém1        | CD14<br>CD40 | 1745    | 17,4    | 3996  | 5874  |      |      |
|             | CD14<br>CD80 | 1931    | 19,3    | 4124  |       | 506  |      |
|             | CD14 Dr      | 1876    | 18,8    | 3937  |       |      | 7724 |
| HP1         | CD14<br>CD40 | 2972    | 29,7    | 3606  | 3763  |      |      |
|             | CD14<br>CD80 | 1939    | 18,4    | 3339  |       | 387  |      |
|             | CD14 Dr      | 1762    | 17,6    | 3209  |       |      | 5965 |
| Tém2        | CD14<br>CD40 | 1193    | 11,9    | 4540  | 1030  |      |      |
|             | CD14<br>CD80 | 866     | 8,7     | 4050  |       | 420  |      |
|             | CD14 Dr      | 986     | 9,9     | 4346  |       |      | 6634 |
| HP2         | CD14<br>CD40 | 1924    | 19,2    | 5568  | 2381  |      |      |
|             | CD14<br>CD80 | 1157    | 11,6    | 4814  |       | 536  |      |
|             | CD14 Dr      | 1633    | 16,3    | 4868  |       |      | 7740 |

[00240] Les résultats les plus significatifs sont ceux obtenus avec les marquages CD14 et CD40. En effet, le marqueur CD14 est exprimé uniquement à la surface des monocytes et non des DC tandis que le  
5 marqueur CD40 est sur-exprimé sur les DC.

[00241] Il a été observé alors que pour le témoin positif (GMIL4), il y a bien eu production de DC, la fluorescence associée au marqueur CD14 étant très faible tandis que celle associée au marqueur CD40 est très  
élevée.

10 [00242] Pour ce qui est du témoin négatif (Mono), les monocytes sont restés sous leur forme initiale, la fluorescence associée au marqueur CD14 étant plus élevée que celle du CD40.

[00243] En ce qui concerne les échantillons de plasma, il est nécessaire de les comparer deux à deux (Tém1/HP1 et Tém2/HP2). Pour  
15 chaque couple d'échantillon, aucune différence n'a pu être décelée au niveau des intensités de fluorescence pour chaque marqueur, ce qui signifie que le procédé objet de l'invention n'induit pas de modification du pouvoir immunogène du plasma.

20 [00244] Tel que démontré dans les exemples précédents, le procédé de la présente invention, permet d'inactiver au moins un agent pathogène, par exemple un agent pathogène dans le plasma sanguin humain, tout en conservant l'activité biologique dudit plasma. Ainsi le plasma obtenu peut, par exemple être utilisé dans le domaine thérapeutique.

25

**Liste des références**

- 5  
5  
10  
15  
20  
25
- (Réf 1)** C. Naegelen, H. Isola, D. Denis, J-P. Maurel, R. Tardivel, S. Bois, C. Vignoli, J-P. Cazenave . 2009. Evolution des techniques de préparation des produits sanguins labiles (PSL) : inactivation des pathogènes dans les PSL. *Transfusion Clinique et Biologique* vol.16 :179-189
- (Réf 2)** A. Jofré, T. Aymerich, N. Grèbol, M. Garriga. 2009. Efficiency of high hydrostatic pressure at 600 MPa against food-borne microorganisms by challenge tests on convenience meat products. *LWT - Food Science and Technology* vol.42(5): 924-928
- (Réf 3)** C.C. Tassou, E.Z. Panagou, F.J. Samaras, P.Galiatsatou, C.G. Mallidis. 2008. Temperature-assisted high hydrostatic pressure inactivation of *Staphylococcus aureus* in a ham model system: evaluation in selective and non selective medium *J. Applied Microbiology* vol.104: 1764-1773
- (Réf 4)** Y. Rigaldie. 2002. Sur l'impact des traitements sous Hautes Pressions dans la décontamination et la stérilisation de formes pharmaceutiques renfermant des molécules thérapeutiques sensibles aux procédés énergétiques. Thèse de l'Université Bordeaux 1 (01/07/2002) N°d'ordre 2526
- (Réf 5)** Y. Rigaldie, G. Lemagnen, A. Largeteau, D. Larroure, M. Abba, R. Haller, L. Grislain, G. Demazeau. 2002. Pharmaceuticals perspectives of high pressure: a soft tool for sterilization of fragile drugs. *Defect and Diffusion Forum* vol.208-209: 55-58
- (Réf 6)** *Pharmacopée Européenne* 5.6. Plasma humain (mélange de) traité pour viro-inactivation. 01/2007 :1646. pp 2439-2441

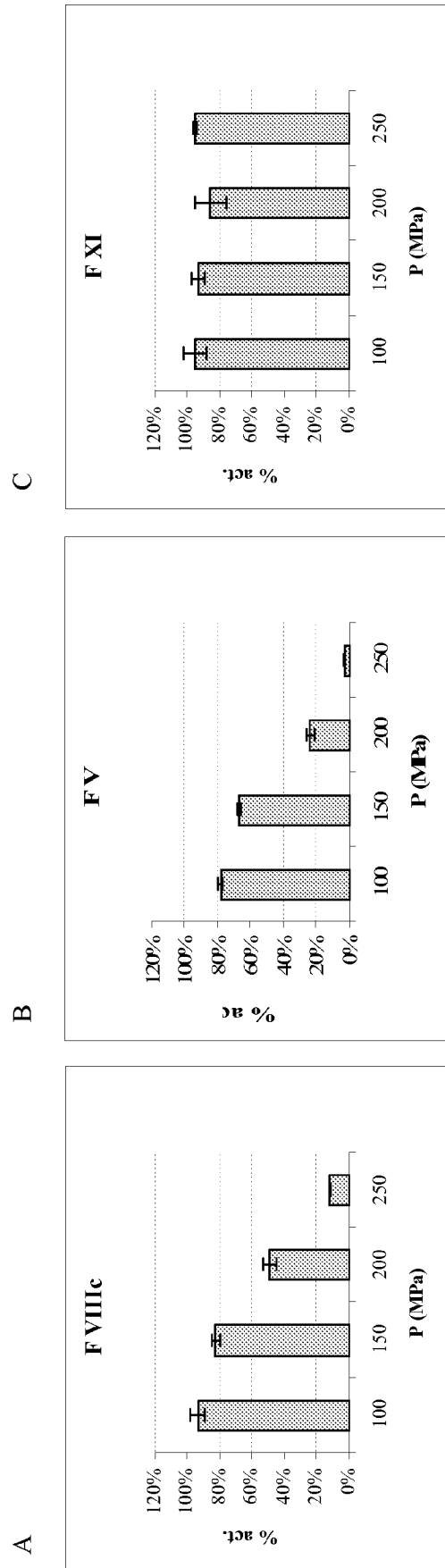
- 5  
5
- (Réf 7)** A. Kunert, J. Losse, C. Gruszin, M. Hühn, K. Kaendler, S. Mikkat, D. Volke, R. Hoffmann, T. Sakari Jokiranta, H. Seeberger, U. Moellmann, J. Hellwage, P. F. Zipfel. 2007. Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. *The Journal of Immunology* vol.179(5): 2979-2988
- 10
- (Réf 8)** A. M. Matser, C. Van Der Ven, C. W. N. Gouwerok, D. De Korte. 2005. High-pressure processing for preservation of blood products. *High Pressure Research* vol.25(1): 37-41
- (Réf 9)** R. A. Hess, M. M. Manak, S. K. Dusing. 2002. Pressure cycling inactivation of pathogens in biological materials used for therapeutics or vaccines. WO 02/056824
- 15
- (Réf 10)** F. Tao, N. Lawrence, C. Li, J. Behnke, J. Lathey, M. Manak, R. T. Schumacher. 2003. Deciphering mechanisms for infectious agent inactivation using cyclic high pressure or pressure cycling technology (PCT). Boston Biomedica Inc. Biophysics Poster 021604.
- 20
- (Réf 11)** S. Dusing, C. Li, J. Behnke, M. Manak, R. Schumacher. 2002. Inactivation of viruses in plasma by cycled pulses of high pressure. *Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology*, R. Hayashi, ed. Elsevier Science B.V. pp 355-359
- 25
- (Réf 12)** J.P.R. Pelletier, S. Transue, E.L. Snyder .2006. Pathogen inactivation Techniques Best Practice and Research Clinic *Haematology*, vol 19 (1) 205-242
- (Réf 13)** *Pharmacopée Européenne* 6.0, 5.1 Textes Généraux sur la microbiologie 01 /2008 :50101
- (Réf 14)** E. Hecht, « Physique », Editeur De Boech (1999)

- (Réf 15) Y. Lambert, G. Demazeau, A. Largeteau, S. Laborde-Croubit, M. Cabannes and J.M. Bouvier. 2000. New packaging solutions for high pressure treatments of foods. High Pressure Research., vol 19, 207-212.
- 5 (Réf 16) *Pharmacopée Européenne*. 5.0 01/2005 : 30203
- (Réf 17) J.O. n°123 du 28 mai 2003, Arrêté du 29 avril 2003 fixant la liste et les caractéristiques des produits sanguins labiles.
- (Réf 18) Transfusion de plasma frais congelé : produits, indications. 2002. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé.
- 10 (Réf 19) Notice d'utilisation. STA – C.K. PREST®. Diagnostica Stago
- (Réf 20) J.A. Laugharn, D.W. Bradley., R.A. Hess, 2000. Rapid Cryobaric sterilization and vaccine preparation, WO 00/48641
- (Réf 21) S. ROZENBLATT, T. KOCH, O. PINHASI, S. BRATOSIN ,
- 15 “Infective substructures of Measles virus from Acutely and Persistently Infected Cells”, J. of Virology (1979), 32, p. 329-333
- (Réf 22) R. RUSTIGIAN « Persistent Infection of Cells in Culture by Measles Virus, I. Development and Characteristics of HeLa Sublines Persistently Infected with Complete Virus », J. of Bacteriology (1966), 92, p.1792-1804.
- 20 (Réf 23) V.R. De SOULTRAIT, A. CAUMONT, V. PARISSI, N. MORELLET, M. VENTURA, C. LENOIR, S. LITVAK, M. FOURNIER, B. ROQUES « A novel short peptide is a specific inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 integrase » J. Mol. Biol. (2002), 318, p.45-58)
- 25 (Réf 24) P. CHARNEAU, G. MIRAMBEAU, P. ROUX, S. PAULOUS, H. BUC, F. CLAVEL , « HIV-1 Reverse Transcription – A termination step at the center of the genome », J. Mol. Biol. (1994), 241, p. 651-662

## Revendications

- 5 1. Procédé d'inactivation d'au moins un agent pathogène d'un échantillon de plasma sanguin humain caractérisé en ce qu'il comprend au moins 5 cycles comprenant chacun :
- la compression dudit échantillon de sa pression initiale  $P_0$  à une pression  $P_1$ ,  $P_1$  étant compris de 190 à 210 MPa, la compression de  $P_0$  à  $P_1$ , la température dudit plasma à la pression
  - 10  $P_1$  étant compris de  $-10^{\circ}\text{C}$  à  $-3^{\circ}\text{C}$  du fait de la compression,
  - le maintien éventuel de la pression  $P_1$  durant un temps compris de 110 à 130 secondes, et
  - la détente de l'échantillon jusqu'à la pression  $P_0$ ,
  - la vitesse d'augmentation de la pression pour ladite
  - 15 compression et la vitesse de diminution de la pression pour ladite détente étant réalisée à une vitesse  $v_1$  de  $47,5$  à  $52,5 \text{ MPa/s}^{-1}$ .
- 20 2. Procédé selon la revendication 1 dans lequel la compression et/ou la détente est adiabatique.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel l'agent pathogène est choisi dans le groupe comprenant les bactéries, les moisissures, les levures, les virus, les protéines infectieuses et/ou les parasites.
- 25 4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel l'échantillon est à une température initiale avant compression comprise de  $-18^{\circ}\text{C}$  à  $-3^{\circ}\text{C}$ .

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel la pression initiale  $P_0$  est de 0,1 MPa.
- 5 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel la pression  $P_1$  est maintenue pendant une durée de 120 secondes.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel la pression  $P_1$  est égale à 200 MPa.
- 10 8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel l'échantillon est dans un emballage hermétique.
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans lequel la pression est appliquée de manière isostatique au moyen d'un milieu transmetteur de pression.
- 15 10. Procédé selon la revendication 9, dans lequel le milieu transmetteur de pression est un milieu liquide polaire ou apolaire.
- 20 11. Procédé selon la revendication 9 ou 10, dans lequel le milieu transmetteur est l'éthanol et/ou un mélange glycol et eau.
12. Utilisation du procédé selon la revendication 1 pour l'élimination sélective d'au moins un agent pathogène dans le plasma sanguin humain.
- 25 13. Plasma sanguin humain obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12.



**Figure 1**

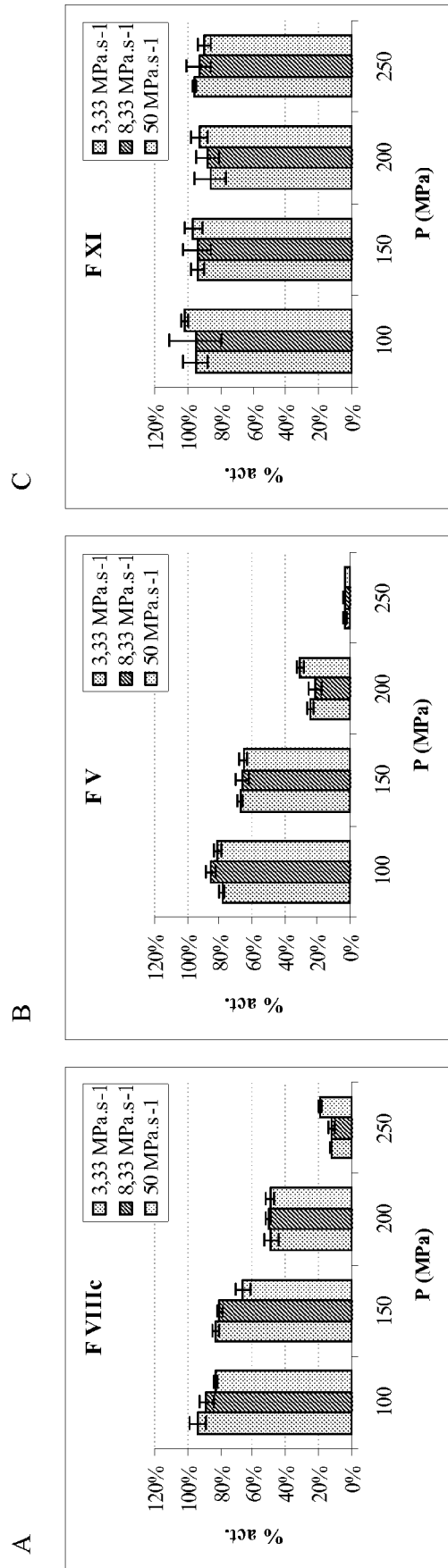


Figure 2

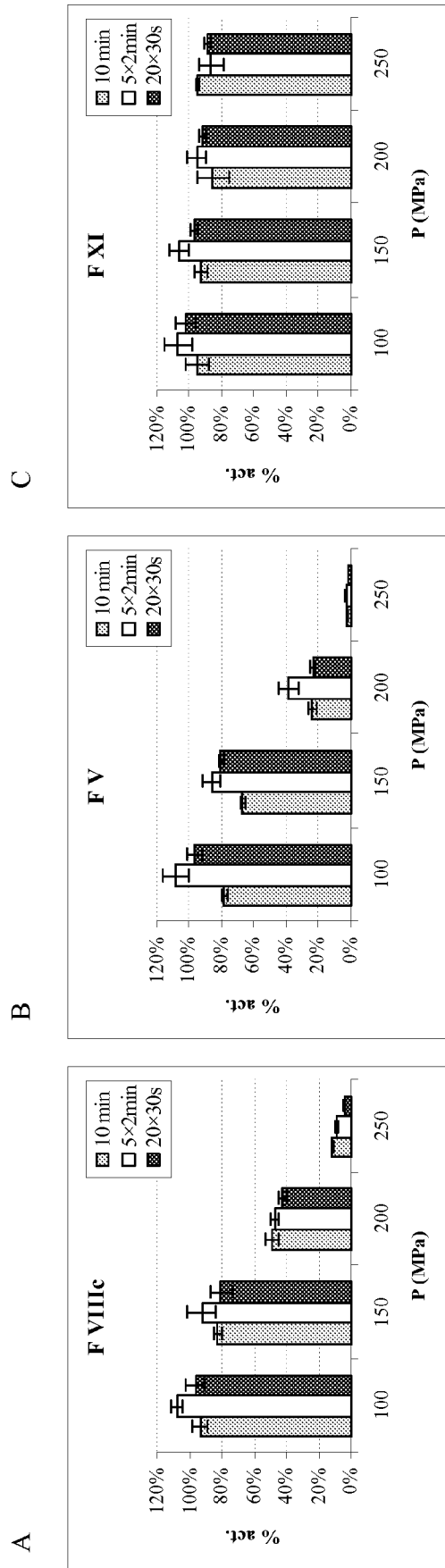


Figure 3

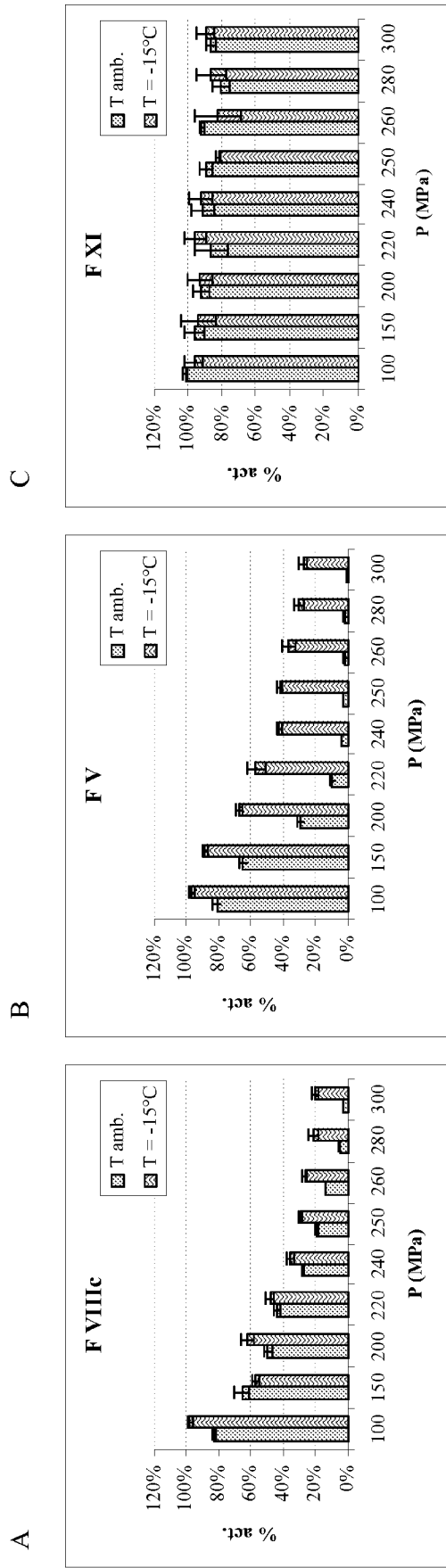


Figure 4

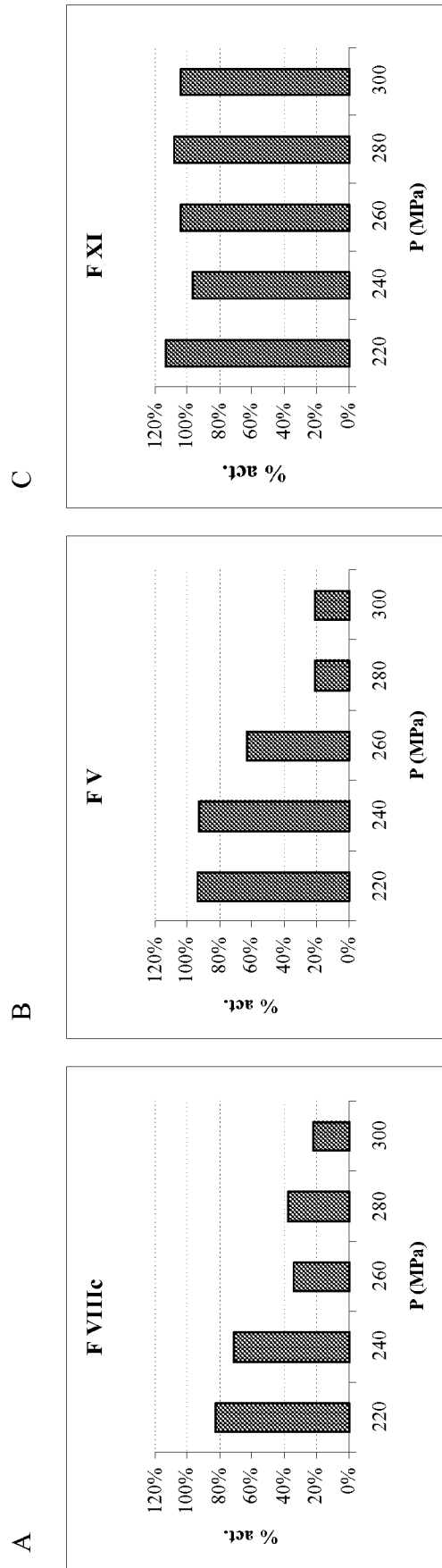
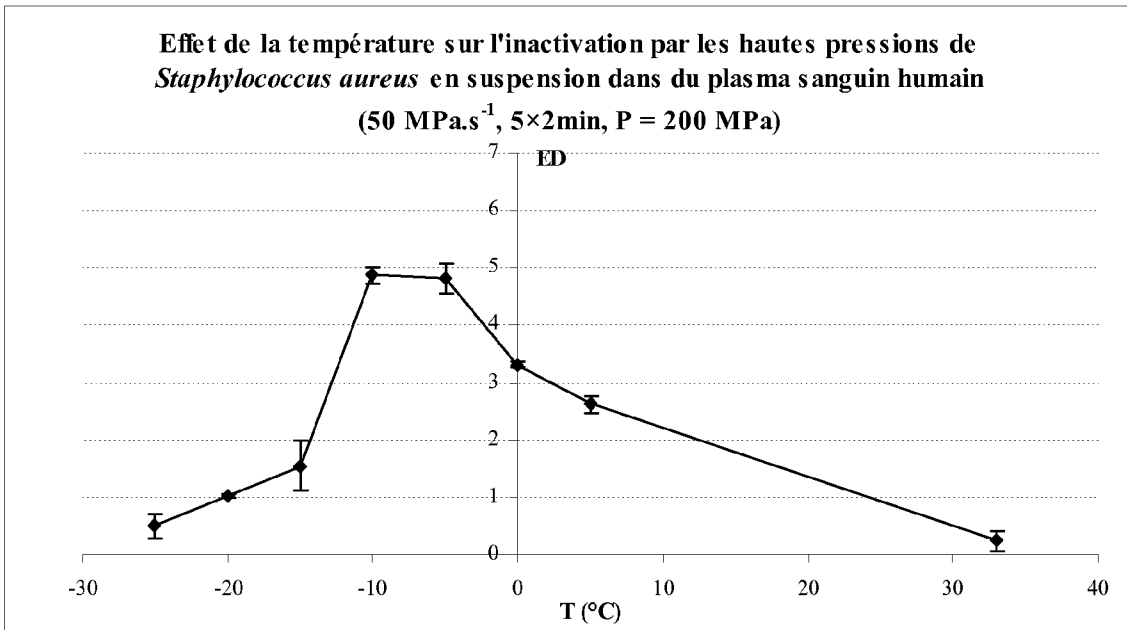
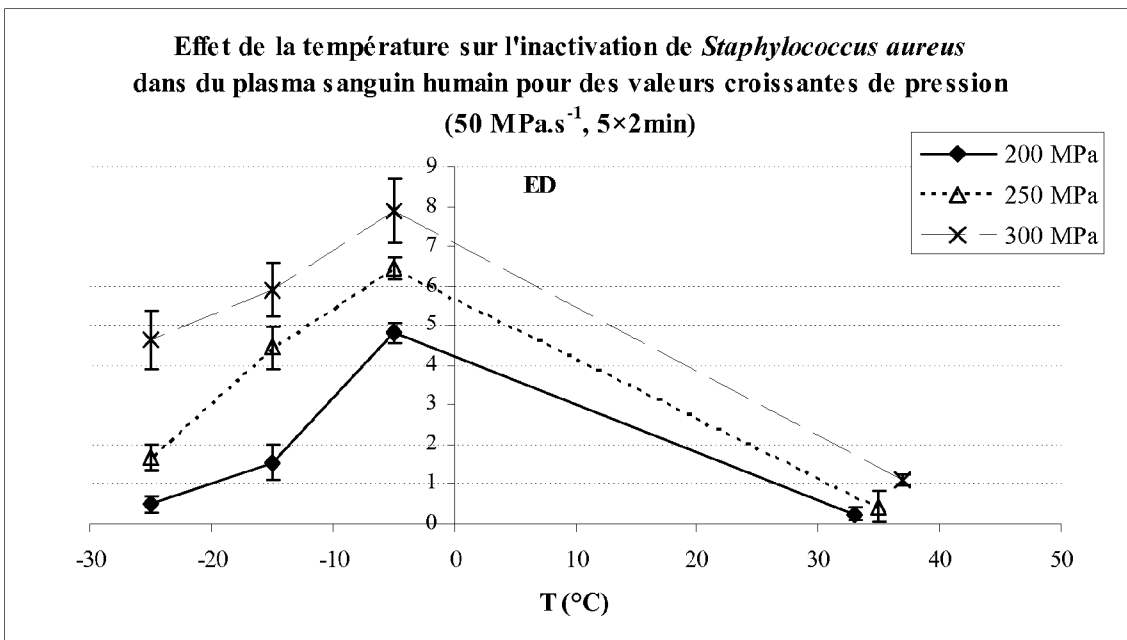


Figure 5

6/15



**Figure 6**



**Figure 7**

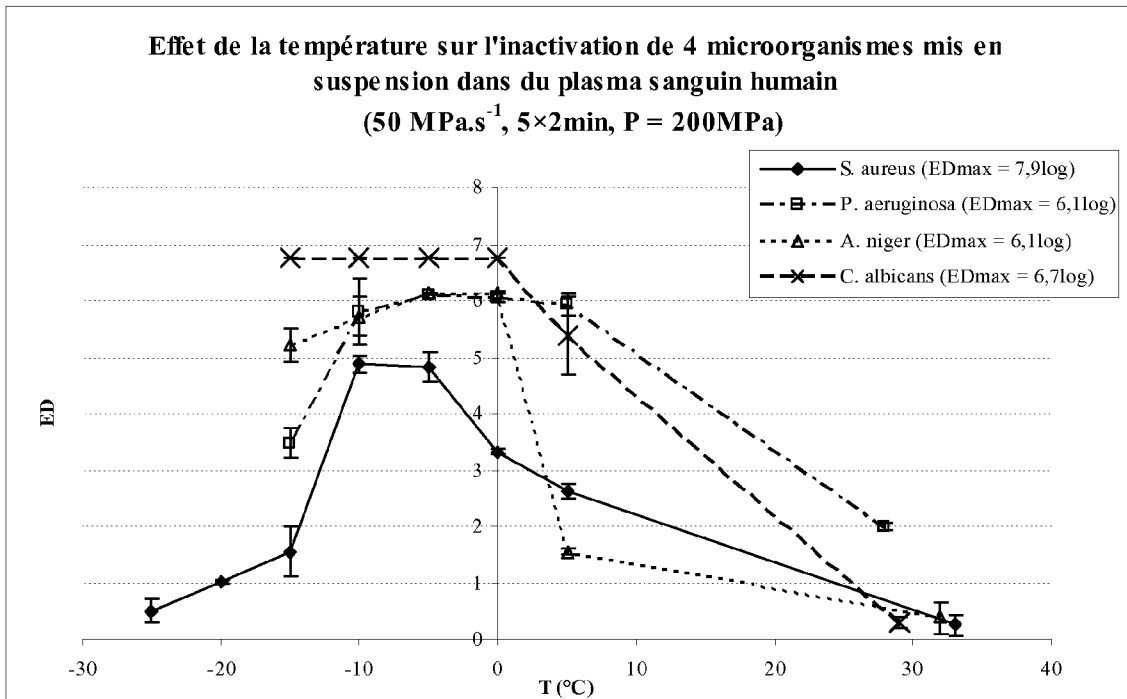


Figure 8

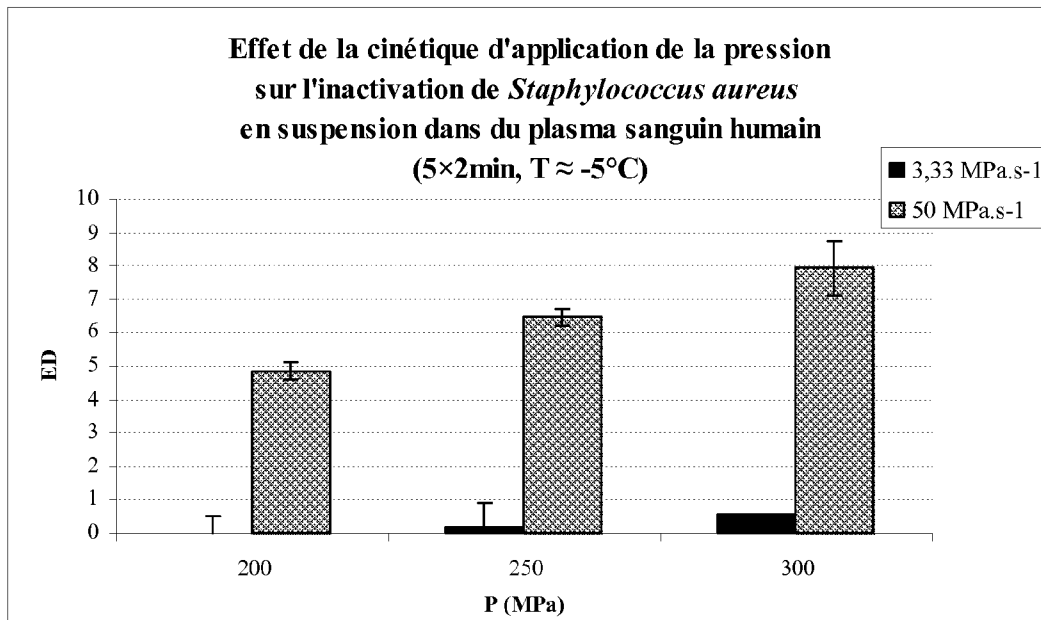


Figure 9

8/15

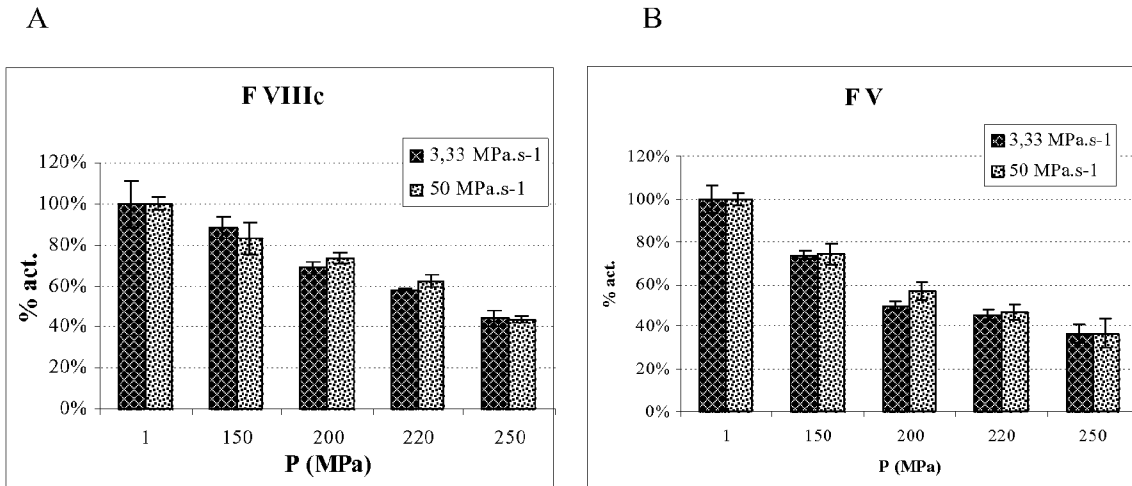


Figure 10

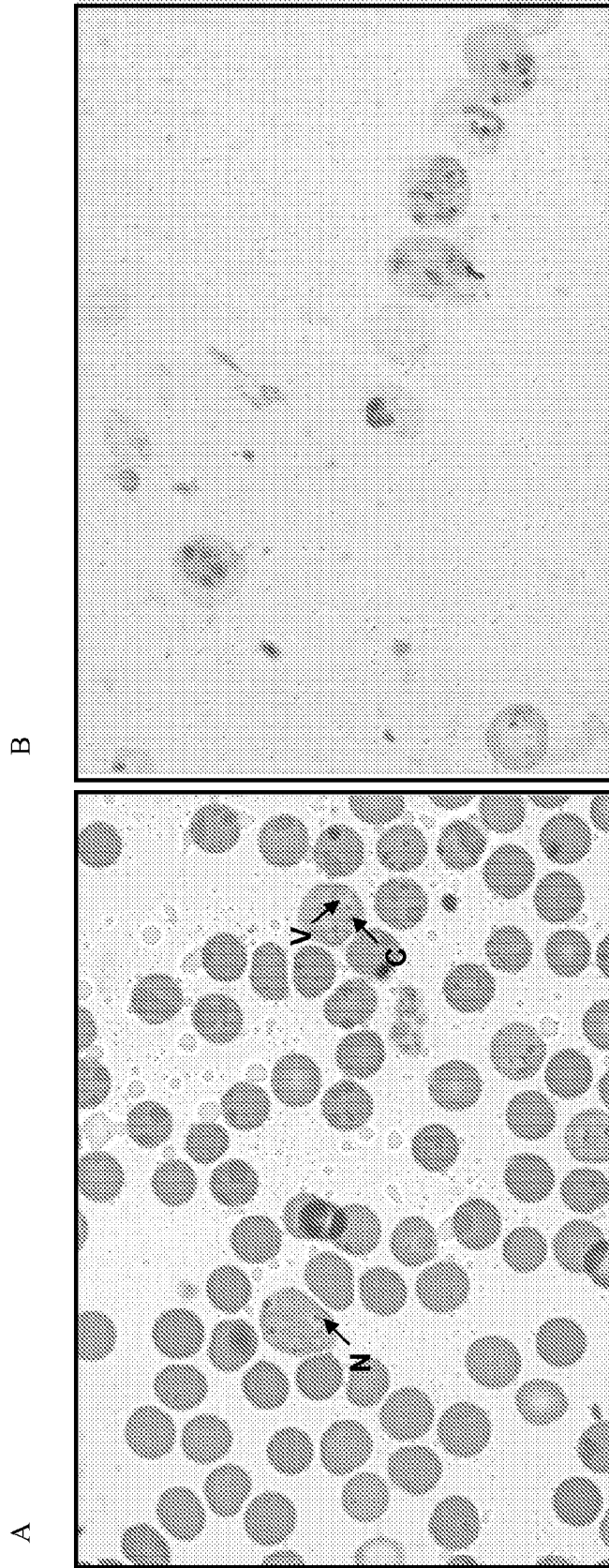


Figure 11



11/15

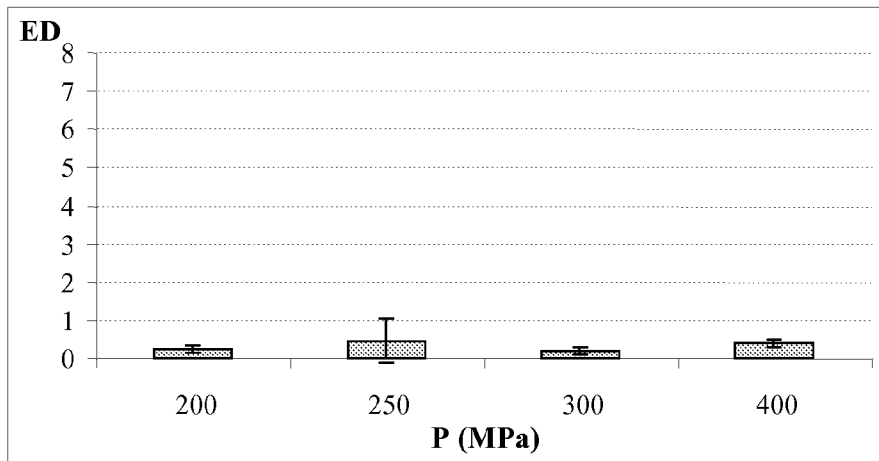


FIGURE 13

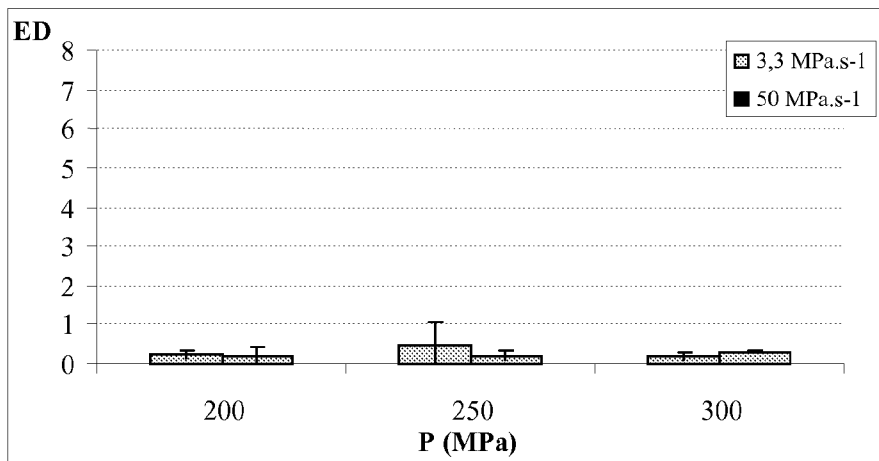


FIGURE 14

12/15

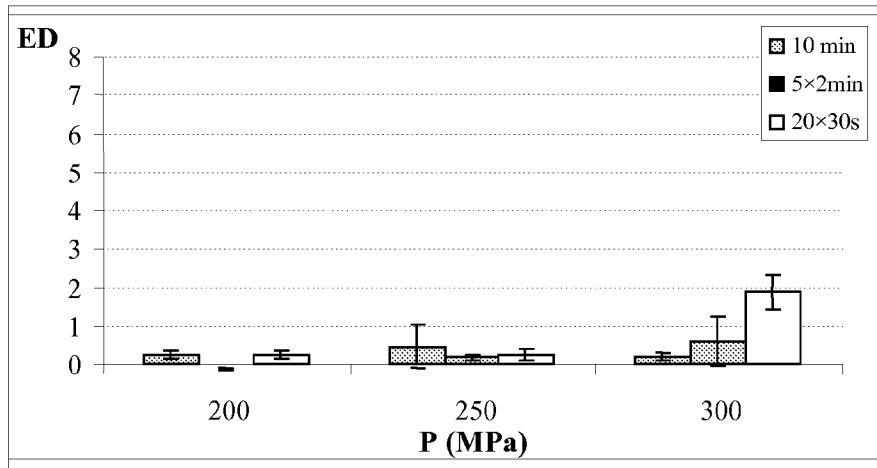


FIGURE 15

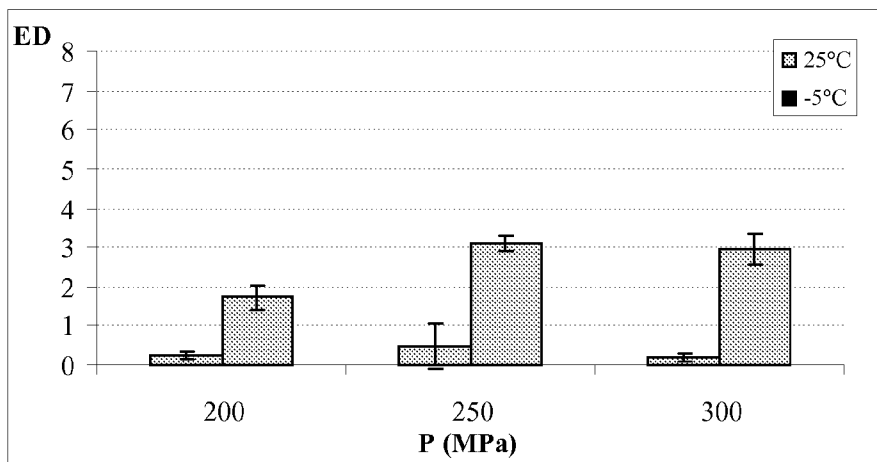


FIGURE 16

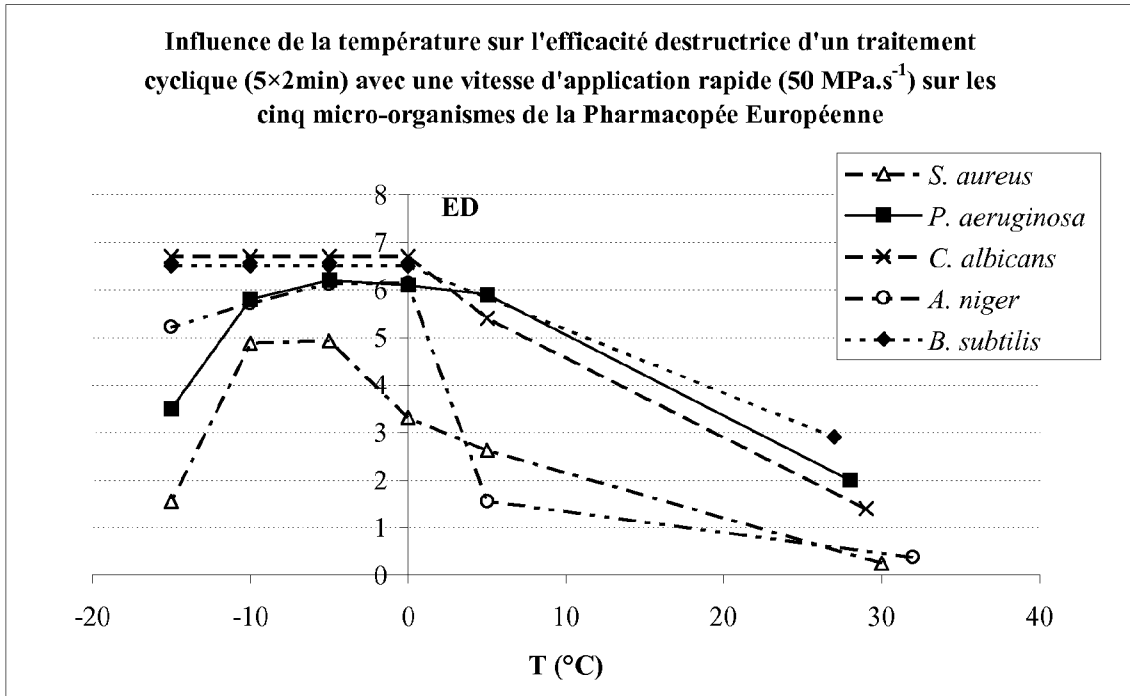


FIGURE 17

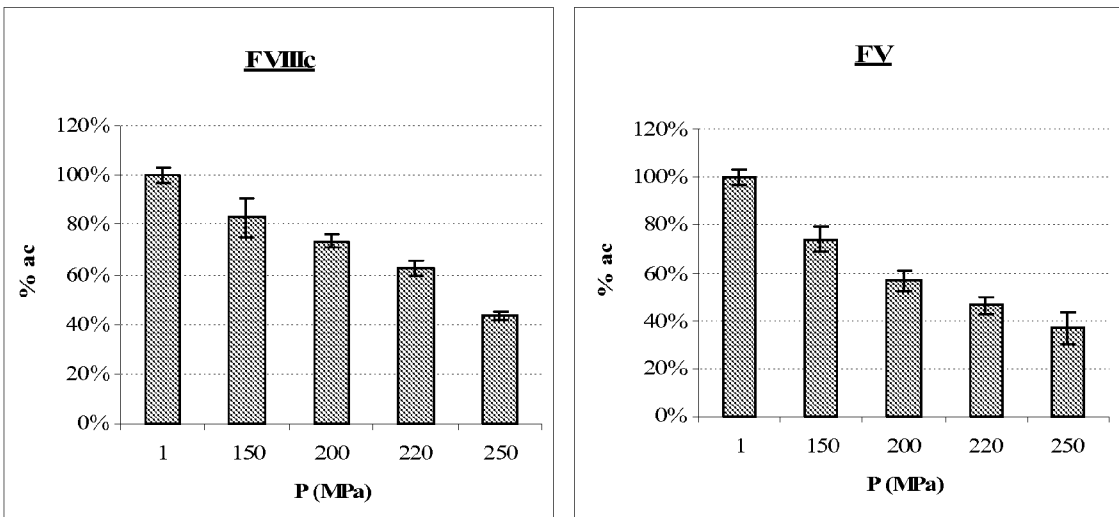


FIGURE 18

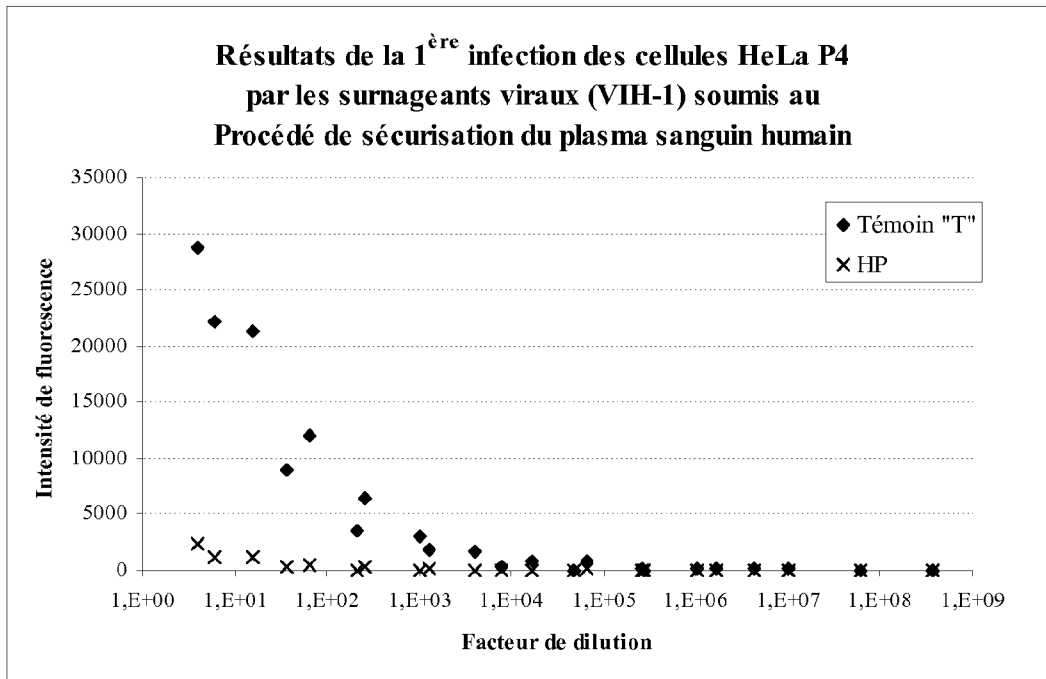


FIGURE 19

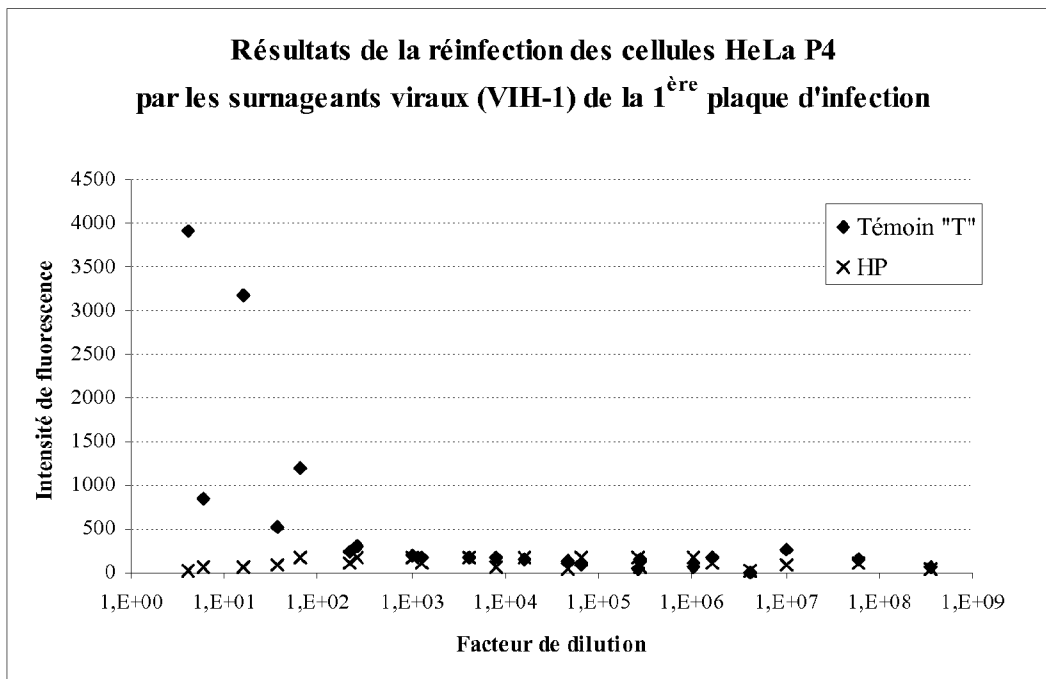


FIGURE 20

15/15

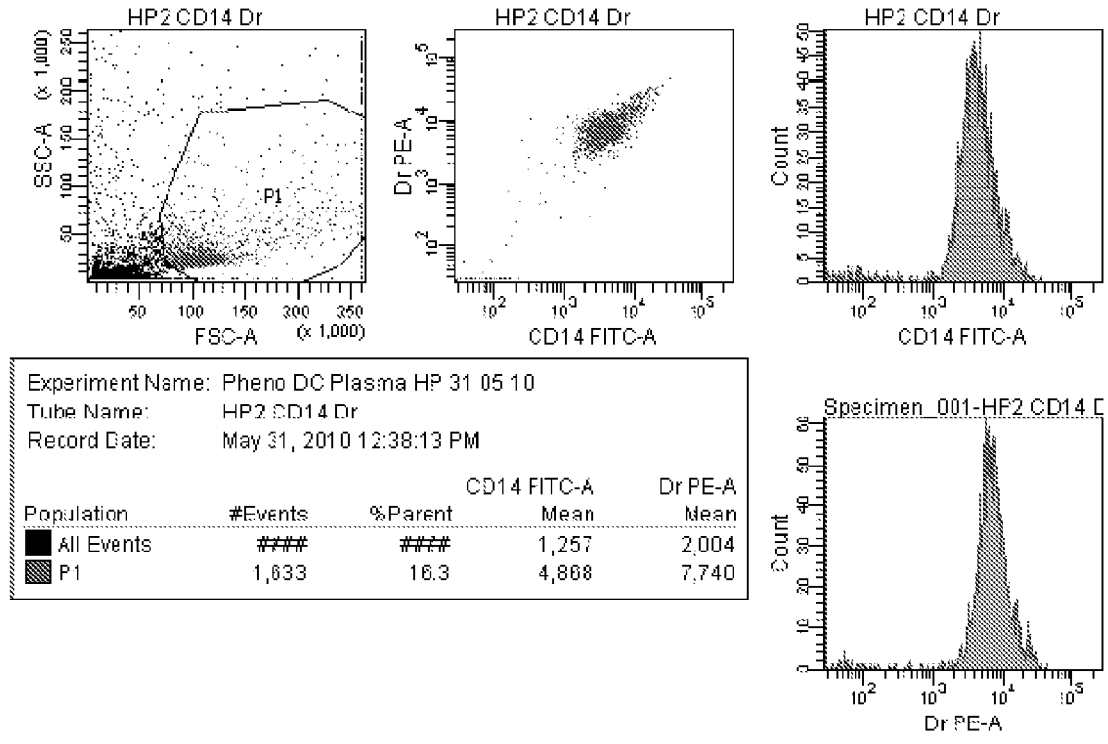


Figure 21