(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication : **2 664 165**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **90 08375**

(51) Int Cl[5] : A 61 K 35/16, 31/725, 31/195, 31/70, 33/06; A 61 L 2/16

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt** : 03.07.90.

(30) **Priorité** :

(43) **Date de la mise à disposition du public de la demande :** 10.01.92 Bulletin 92/02.

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

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

(71) **Demandeur(s) :** *CENTRE REGIONAL DE TRANSFUSION SANGUINE DE LILLE Association régie sous la loi de 1901* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** Burnouf Julia, Mirijana, née Radosevich et Burnouf Thierry.

(73) **Titulaire(s) :**

(74) **Mandataire :** Armengaud Jeune Cabinet Lepeudry.

(54) Composition pour stabiliser le plasma sanguin en cours de pasteurisation.

(57) L'invention concerne une composition destinée à stabiliser le plasma sanguin, total ou dépourvu de cryoprotéines, en cours de pasteurisation. La composition selon l'invention permet de pasteuriser de très grands volumes de plasma (jusqu'à plusieurs centaines de litres).

L'invention concerne également le procédé de pasteurisation du plasma utilisant la composition stabilisante.

Le plasma pasteurisé obtenu est destiné à un usage thérapeutique.

FR 2 664 165 - A1

2664165

L'invention concerne une composition permettant de stabiliser le plasma sanguin en cours de pasteurisation, un procédé utilisant ladite composition et les solutions plasmatiques ainsi obtenues, particulièrement destinées aux thérapies de substitution de plasma et des facteurs V, XI et XIII de la coagulation sanguine.

Le plasma humain total ou dépourvu de cryoprotéines est encore utilisé comme thérapie de substitution pour les grands brûlés, les sujets gravement traumatisés ou ayant subi d'importantes interventions chirurgicales, c'est-à-dire dans tous les cas où les patients subissent d'importantes pertes de fluides.

On utilise généralement, pour ce type de thérapie, du plasma provenant de dons unitaires, de sujets sains et préalablement contrôlés, pour éviter les risques de transmission de maladies virales. Cette procédure ne permet cependant pas d'éliminer tous les risques de contamination par des virus en phase pré-sérologique, en particulier les différents virus de l'hépatite et le virus du SIDA.

Il serait donc avantageux de mettre au point une méthode d'inactivation virale qui n'altère pas les différentes fonctions biologiques du plasma.

Il a été bien démontré que le virus de l'Hépatite B était totalement inactivé par un chauffage à 60°C pendant 10 heures, en présence de citrate de sodium 0,5 M (Tabor et al. Thrombosis Res. 22, 1981, 233-238).Toutefois ce traitement entraîne une perte d'activité biologique de certaines protéines du plasma (Tabor et al. et Barrowcliffe et al. Fr. J. Haematology 55, 1983, 37-46).

Différentes protéines d'intérêt thérapeutique, purifiées à partir du plasma sanguin, ont pu être soumises à une pasteurisation classique à 60°C pendant 10 heures en présence de divers stabilisants. On constate toutefois que des molécules qui stabilisent une activité biologique peuvent être totalement inefficaces sur une autre.

Ainsi l'albumine peut être stabilisée par l'acétyl-tryptophane et le caprylate (Gellis et al. J. Clin.

Invest. 27, 1948, 239-244) alors que ces stabilisants sont sans effet sur le plasminogène. La thrombine peut être stabilisée par des concentrations élevées de glycosides (Seegers.Arch. Biochem. 3, 1944, 363-367) alors que celles-ci ne protègent pas la prothrombine. L'addition d'un acide aminé et d'un glucide a donné de bons résultats avec le Facteur VIII et l'antithrombine III (voir brevet DE 29.16.711).

Le brevet européen 0 035 204 met en évidence une stabilisation de l' α antitrypsine, de l'antithrombine III, de la prékallikréine, de la fibronectine et du Facteur VIII en présence d'un polyol, celui-ci n'étant exemplifié que par le saccharose ; il signale cependant que dans les mêmes conditions le Facteur IX et la prékallikréine perdent toute leur activité thérapeutique.

Ces différentes données expérimentales confirment l'idée généralement admise que l'inactivation virale du plasma total (plasma frais, plasma frais congelé ou surnageant de cryoprécipité) ne peut pas être réalisée par une pasteurisation.

Le besoin médical existant encore pour du plasma total, la Demanderesse a cherché à mettre au point une composition assurant la protection simultanée de l'activité biologique de tous les facteurs d'intérêt thérapeutique contre la dénaturation en cours de pasteurisation.

Ayant observé que le sorbitol offrait une certaine protection contre la dénaturation thermique, mais avec des résultats variables d'un échantillon de plasma à l'autre et avec de faibles rendements, la Demanderesse a cherché différents additifs dont le mélange avec le sorbitol augmenterait son pouvoir stabilisant.

Ainsi la composition selon l'invention est constituée d'un mélange de sorbitol, de chlorure de calcium, d'héparine et de lysine. Les concentrations des différents constituants sont ajustées pour donner une concentration finale dans le plasma à pasteuriser de

- 50 à 80 % en sorbitol et, de préférence, de 60 %

- 0,1 à 1 U/ml d'héparine et de préférence, de 0,5 U/ml
- 1 à 10 g/l de lysine et, de préférence , de 4 g/l
- 3 à 5 mM en $CaCl_2$ et de préférence, de 4 mM.

La compositon selon l'invention est additionnée au plasma frais ou au plasma frais congelé-décongelé ou au plasma dépourvu des protéines du cryoprécipité, avant de soumettre celui-ci à une pasteurisation par chauffage à 60°C±1°C pendant 10 heures.

Après la pasteurisation, la température est abaissée progressivement jusqu'à 20°C et la solution est soumise à une dialyse pour éliminer le sorbitol et l'héparine. Le tampon de dialyse est à pH 7, contient du citrate de sodidum à une concentration comprise entre 4 et 10 mM, du chlorure de calcium 4 mM, du chlorure de sodium 0.13 M et de la lysine à une concentration de 4 g/l. Des tampons de dialyse de composition différente peuvent aussi être utilisés en fonction des besoins. La solution est ensuite concentrée pour rétablir le dosage physiologique des protéines plasmatiques. La solution résultante est soumise à une filtration stérilisante, conditionnée puis congelée ou lyophilisée.

L'invention concerne également le procédé de pasteurisation du plasma qui comprend l'addition de la composition selon l'invention dans le plasma, avant son chauffage, et ensuite la dialyse du plasma pasteurisé contre le tampon tel que defini plus haut.

Ce procédé est particulièrement avantageux parce qu'il peut être appliqué à de grands lots de plasma provenant de plusieurs récoltes indépendantes. Plus particulièrement, la pasteurisation de lots de 100 à 200 litres ou plus permet, après avoir effectué les contrôles appropriés, de garantir une constance de qualité des lots.

D'autre part, les lots de plasma pasteurisés par le procédé selon l'invention peuvent également servir de produits de substitution pour les malades présentant des déficiences en facteurs de la coagulation dont il n'existe pas de concentrés purifiés tels que le Facteur V, le Facteur

XI et le Facteur XIII.

L'invention concerne donc également les solutions plasmatiques pasteurisées obtenues par le procédé selon l'invention et plus particulièrement destinées - d'une part au traitement des déficiences en Facteurs V, XI et XIII de la coagulation et - d'autre part aux thérapies de remplacement nécessitant du plasma total ou du surnageant de cryoprécipité.

L'exemple suivant décrit un mode de réalisation de l'invention sans toutefois en limiter la portée.

EXEMPLE :

Deux litres de plasma décongelé sont additionnés d'héparine (1000 U) de lysine (8 g) et de chlorure de calcium 220 mg. Ces deux produits sont ajoutés sous la forme de sels en poudre, le plasma étant soumis à une agitation douce. Puis, 1200 g de sorbitol non dissous sont versés progressivement.

La pasteurisation est réalisée dans un récipient de 5 litres par chauffage à 60°C pendant 10 heures à l'aide soit d'un bain-marie, soit dans une cuve thermostatée. Après pasteurisation, le sorbitol et l'héparine sont éliminés par dialyse avec un rein artificiel ou un système d'ultrafiltration tel que le système Pellicon sur cassettes, en utilisant un tampon citraté contenant de la lysine à une concentration de 4 g/l, du $CaCl_2$ 4mM et du NaCl 0,13 M. La dialyse peut être suivie d'une concentration sur le même matériel pour ramener les taux en facteurs de coagulation à près d'1 U/ml comme dans un plasma thérapeutique de bonne qualité. Le matériel est dialysé à une osmolarité de 370 mosmol/l et un pH de 7. Le produit est ensuite filtré stérilement, par exemple sur filtre Millipack 40 (Millipore) à pores de 0.22 µm. La répartition du matériel s'effectue dans des poches de plastique pour congélation ou dans des flacons pour lyophilisation.

La stabilisation du plasma lors de la pasteurisation et de l'ultrafiltration par addition de calcium, d'héparine et de lysine permet d'obtenir les

rendements suivants, par rapport à (noté ci-dessous vs) un témoin ne contenant que de la lysine et du sorbitol.

FVIIIc	87 % vs 66 %
FVc	77 % vs 35 %
FVIIc	55 % vs 52 %
FIXc	60 % vs 49 %
fibrinogène coagulable	81 % vs 57 %
FXIII	77 % vs 71 %

Il n'est pas observé de signes d'activation des facteurs de coagulation en présence de cette quantité de calcium. Ainsi le rapport FVII bovin/FVII coagulant est de 0,95 vs 1,09 pour le témoin. La stabilité, testée en suivant l'activité de FVIII après 24 heures de conservation du produit à l'état liquide et à température ambiante, n'est pas altérée par rapport au témoin (récupération de 100 % de l'activité). Ceci est à l'appui d'un taux en PKA < 2 % pour les produits pasteurisés et témoins.

De plus des contrôles sur le rat, par injection intraveineuse de plasma ainsi pasteurisé, indiquent l'absence d'effet hypotenseur et ne révèlent aucune modification du rythme cardiaque.

REVENDICATIONS

1.- Composition pour stabiliser le plasma sanguin en cours de pasteurisation caractérisée en ce qu'elle est constituée d'un mélange de sorbitol, d'héparine, de chlorure de calcium et de lysine

2.- Composition selon la revendication 1 caractérisée en ce que la concentration sorbitol est comprise entre 500 et 800 g/l.

3.- Composition selon la revendication 2 caractérisée en ce que la concentration de sorbitol est de 600 g/l.

4.- Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisée en ce que la concentration d'héparine est comprise entre 100 et 1000 U/l.

5.- Composition selon la revendication 4 caractérisée en ce que la concentration d'héparine est de 500 U/l.

6.- Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 caractérisée en ce que la concentration en chlorure de calcium est comprise entre 3 et 5 mM.

7.- Composition selon la revendication 6 caractérisée en ce que la concentration de chlorure de calcium est de 4 mM.

8.- Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 caractérisée en ce que la concentration de lysine est comprise entre 1 et 10 g/l.

9.- Composition selon la revendication 8 caractérisée en ce que la concentration de lysine est de 4 g/l.

10.- Procédé de pasteurisation du plasma sanguin caractérisé en ce qu'il comprend l'addition de la composition selon l'une quelconque des renvendications 1 à 9 dans le plasma, avant l'étape de chauffage, et, ensuite, l'élimination de ladite composition par dialyse.

11.- Procédé selon la revendication 10 caractérisé en ce que la dialyse est effectuée à pH 7 contre du tampon contenant du citrate de sodium à une concentration comprise

entre 4 et 10 mM, du chlorure de calcium 4 mM, du chlorure de sodium 0,13 M et de la lysine à une concentration de 4 g/l.

12.- Procédé selon la revendication 10 ou 11 caractérisé en ce qu'il est applicable à des volumes de plasma compris entre 1 litre et plusieurs centaines de litres.

13.- Solution plasmatique à usage thérapeutique destinée à compenser la déficience en Facteurs V, XI et XIII de la coagulation sanguine, caractérisée en ce qu'elle a été obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 12.

14.- Plasma total à usage thérapeutique caractérisé en ce qu'il a été pasteurisé par le procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 12.

15.- Surnageant de plasma cryoprécipité et dépourvu de cryoprotéines, à usage thérapeutique, caractérisé en ce qu'il a été pasteurisé par le procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 12.

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

2664165

N° d'enregistrement national

RAPPORT DE RECHERCHE

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

FR 9008375
FA 445548

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendications concernées de la demande examinée
A	EP-A-0 137 428 (BEHRINGWERKE AG) * Revendications 1,2,5,6 *	1-15
A	EP-A-0 053 338 (BEHRINGWERKE AG) * Les revendications *	1-15
A	WO-A-8 906 547 (NORDISK GENTOFTE A/S) * Revendications *	1-15
A	EP-A-0 176 926 (MILES LABORATORIES) * Page 25, lignes 16-32; exemple 4 *	1-15
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 101, no. 14, 1 octobre 1984, page 345, résumé no. 116629v, Columbus, Ohio, US; A.J. MacLEOD et al.: "Stabilization of proteins to heat", & RES. DISCL. 1984, 244, 380 * Résumé en entier *	1-15

DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)

A 61 L
A 61 K

Date d'achèvement de la recherche: 15-03-1991

Examinateur: RYCKEBOSCH A.O.A.

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

X : particulièrement pertinent à lui seul
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie
A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général
O : divulgation non-écrite
P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons

& : membre de la même famille, document correspondant

EPO FORM 1503 03.82 (P0413)