

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :

(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 492 269

A2

**DEMANDE
DE CERTIFICAT D'ADDITION**

(21)

N° 81 05454

Se référant : au brevet d'invention n° 80 25363 du 28 novembre 1980.

(54)

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

(51)

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

(22)

Date de dépôt..... 18 mars 1981.

(33) (32) (31)

Priorité revendiquée : EUA, 16 octobre 1980, n° 197.394.

(41)

Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 16 du 23-4-1982.

(71)

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

(72)

Invention de : Surendar Mohan Jain.

(73)

Titulaire : *Idem* (71)

(74)

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

Certificat(s) d'addition antérieur(s) :

L'invention concerne un appareil d'électrodialyse et un procédé de fractionnement de mélanges de protéines.

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

La présente addition a pour but de perfectionner le brevet principal et concerne à cet effet un procédé de fractionnement de mélanges de protéines liquides dans lequel on sépare un mélange aqueux de protéines en fractions de compositions intrinsèquement différentes.

Les fluides biologiques, tels que le plasma ou le sérum du sang, le lait, le petit-lait, l'urine etc.. contiennent un mélange de diverses protéines.

Par exemple le plasma sanguin contient de l'albumine (3,5 à 4,5 g/100 ml), du fibrinogène (0,20 à 0,45 g/100 ml) de la γ -globuline (0,4 à 1 g/100 ml) de la β -globuline (0,4 à 1,8 g/100 ml) de l'immunoglobuline Ig M (0,6 à 0,25 g/100 ml) etc... (Frank W. Putnam, The Trace Components of Plasma, An Overview). Les immunoglobulines (Ig) sont très importantes car elles entrent en jeu dans les mécanismes de protection et de défense contre les organismes infectieux.

Les troubles cliniques caractérisés par des déséquilibres de ces systèmes de protéines, soit dans la faculté de reconnaître des organismes d'invasion soit dans la faculté de reconnaître des acides indigènes de protéines ou 5 des acides polyméthyléniques, ont été à l'origine de la compréhension des aspects cliniques de l'immunologie. On sait en effet que des réactions immunologiques anormales produisent un large spectre de maladies.

Parmi les maladies liées à des réactions immunologiques complexes, on peut par exemple citer la maladie du sérum, la glomérulonéphrite et la gravis myasthenique. La plasmaphorèse est une technique utilisée pour réduire, freiner ou stopper le processus immunopathologique associé à la circulation d'un anticorps humorale et/ou de composés immunologiques 15 complexes du plasma (Glassman, Rationale for Plasmapheresis, "Plasma Therapy", Vol. 1, n° 1, Page 13 (1979)).

Un procédé connu consiste à effectuer la plasmaphorèse d'environ 4 litres de plasma pendant une période de 2 à 4 heures. Le plasma ainsi fonctionné sur le patient est généralement jeté et remplacé par de l'albumine et, soit du sérum physiologique soit une solution de Ringer, pour obtenir l'équilibre entre les protéines, l'électrolyte et l'eau. Ce procédé cependant est cher. Dans un autre procédé, le remplacement du plasma éliminé se fait en apportant du plasma 25 frais ou congelé. Ce procédé, bien que moins cher, présente cependant des risques de transmission de virus d'hépatite au patient.

Le procédé selon l'invention (appelé immunophorèse) permet de pallier les inconvénients ci-dessus de l'art antérieur en éliminant sélectivement les immunoglobulines, les englobulines ou les mélanges complexes d'englobulines et d'antigènes produisant la maladie ou résultant de celle-ci, tout en reconstituant en même temps la majeure partie de l'albumine, de l'électrolyte (sel) et de l'eau, pour restituer ainsi au patient son propre plasma (pratiquement sans mélanges complexes d'Ig ou d'antigènes Ig) contenant le dosage convenable de protéines, sans risque d'hépatite car il n'est pas nécessaire d'ajouter de l'albumine ou du plasma du donneur.

Le facteur d'antihémophilie ou globuline antihémophile (Facteur VIII, AHF ou AHG) est l'un des

éléments intervenant dans la coagulation du sang. Une anomalie héréditaire de la coagulation du sang, ou hémophilie, entraîne des saignements très importants aux jointures, dans les muscles ou dans les organes internes aux moindres traumatismes. Ces 5 troubles apparaissent comme étant dus à une déficience en protéine spécifique AHF du plasma. Les individus affectés de ces troubles doivent le plus souvent recevoir des soins particuliers après les moindres accidents. En cas d'opérations chirurgicales on corrige le défaut de coagulation par des transfusions de plasma frais ou par des injections de Facteur VIII concentré, cette 10 dernière solution étant préférable car elle évite les hyperprotéinémie et les troubles rénaux résultant de grands volumes de transfusions.

Les procédés, selon l'art antérieur, 15 de production de AHF consistent par exemple à utiliser une réserve commune de plasma, ou banque de plasma, à former un cryoprecipité, à centrifuger le précipité constitué essentiellement d'un mélange de AHF et de fibrinogène, et à utiliser ensuite une lyophilisation pour produire le concentré de AHF. Cependant ces procédés 20 présentent tous l'inconvénient d'être longs et fastidieux, et de plus présentent des risques de transmissions d'hépatites par la source commune ou banque de plasma. Par ailleurs la présence de l'impureté de fibrinogène rend difficile la dissolution du concentré d'AHF. Enfin, le fait que plusieurs jours s'écoulent 25 entre le moment où le plasma est donné et le moment où il est utilisé, conduit à une perte considérable d'activité de l'AHF.

L'AHF unitaire se définit comme l'activité régnant dans 1 ml. de plasma humain moyen normal vieux de moins d'une heure (100 % de niveau AHF). Ainsi, au bout de 30 six heures la perte d'activité du plasma liquide extra corporel peut atteindre 80 %. Un procédé de traitement rapide de l'AHF permet d'empêcher cette perte d'activité.

Les appareils et procédés selon l'invention ont pour but de pallier les inconvénients ci-dessus par un traitement continu en temps réel. Cela permet une récupération de AHF de l'ordre de 4 à 5 fois celle des procédés actuels beaucoup plus longs.

L'invention peut également s'adapter 40 à une banque de plasma de volume plus faible, contenant par exemple 2 à 3 éléments sans risques d'hépatites, de la famille

des hémophiles, la récupération de AHF se faisant aussitôt après in-situ, ce qui permet ainsi d'obtenir, sans risque d'hépatite du AHF à activité très élevée. Les procédés en continu selon l'invention peuvent également s'utiliser pour récupérer le

5 Facteur VIII des donneurs pendant la plasmaphorèse.

Les techniques de base utilisées dans l'invention, c'est-à-dire la plasmaphorèse et l'électrodialyse, sont toutes deux bien connues de l'art antérieur. La combinaison nouvelle des techniques décrites ici produit un effet de synergie, 10 c'est-à-dire une augmentation du rendement de chaque étape de la combinaison. Cette augmentation surprenante de rendement est extrêmement utile, en particulier pour les soins in-situ en temps réel sur des patients à qui il faut ponctionner des Ug ou des composés complexes de ces Ig.

15 Les procédés selon l'invention seront décrits sur les exemples préférés du plasma et du petit-lait, mais il est évident que l'invention s'applique aussi bien à d'autres fluides biologiques ou d'autres protéines sans limitation de sa portée. L'utilisation de l'électrodialyse pour saturer de sel ou au contraire dessaler le fluide biologique, afin 20 d'obtenir une séparation des protéines, est un outil extrêmement efficace entre les mains des chimistes des protéines.

A cet effet l'invention concerne un procédé de fractionnement de mélanges de protéines liquides 25 conforme au brevet principal suivant lequel on sépare un mélange aqueux de protéines en fractions de compositions intrinsèquement différentes, procédé caractérisé en ce qu'il consiste à retirer tout le précipité troublant le mélange aqueux ; à faire passer ensuite ce mélange à une vitesse de l'ordre de 3 à 40 cm/sec. 30 dans un appareil d'électrodialyse contenant au moins une paire de membranes voisines définissant entre elles une chambre de débit de liquide ; à appliquer un courant électrique dans cet appareil avec un rapport $\frac{CD}{K^2}$ d'environ 0,1 à 10 (CD étant la densité de courant en mA/cm^2 et K la conductivité du mélange 35 aqueux en millisiemens/cm) pour modifier ainsi l'environnement ionique du mélange d'une valeur suffisante pour déstabiliser au moins partiellement une ou plusieurs protéines du mélange ; à laisser précipiter la protéine déstabilisée ; et à retirer ensuite tout le précipité obtenu en maintenant la température 40 du mélange dans une plage de l'ordre de 0 à 40° C pendant toute

l'opération de séparation.

L'invention utilise l'électrodialyse pour séparer des mélanges aqueux de protéines en fractions de compositions intrinsèquement différentes pouvant se distinguer 5 par des procédés physiques ou chimiques bien connus. Pour cela l'invention utilise le fractionnement ou la séparation partielle de mélanges de protéines puis la reconstitution ultérieure de leur équilibre en sel et en eau. L'invention concerne non seulement le fractionnement par appauvrissement en sel (dessalage) 10 mais également le fractionnement par enrichissement en sel (saturation en sel).

Les mélanges de protéines comprennent essentiellement (mais pas exclusivement) le plasma, le sérum ou leurs dérivés. Le processus d'électrodialyse utilisé dans le 15 dessalage élimine les sels dissous (ions) et, par suite, les englobulines ou leurs composés sont complètement précipités par réduction de leur concentration ionique, combinée si on le désire à des modifications de température et/ou de pH. Dans 20 l'élimination des sels, l'interaction des ions salins avec les groupes ionisables de protéines se trouve apparemment réduite, ce qui permet une interaction entre les molécules d'englobulines et par conséquent la précipitation de celles-ci.

L'albumine et autres protéines qui ne sont pas des englobulines par nature, ne donnent pas de précipités 25 pour les concentrations en sel (faibles) convenant aux englobulines, et restent donc en solution pour les restitutions ultérieures au patient ou pour les récupérations. Après élimination des éléments troubles (ou précipités) d'englobulines, on peut facultativement ramener la concentration du plasma à sa valeur 30 initiale exacte en utilisant le plasma dessalé comme fluide récepteur de sel dans une colonne ou un module d'électrodialyse. Le plasma dessalé se trouve ainsi complètement restitué dans les électrolytes (et dans l'eau) et peut donc être restitué au donneur ou au patient sans autre modification de la teneur en sel ou en 35 eau.

Dans la forme de mise en oeuvre du processus correspondant à la saturation saline, on ajoute du sel au mélange de protéines pour provoquer la précipitation une par une des diverses protéines lorsque la concentration ionique augmente. 40 Les agents de saturation saline agissent apparemment dans ce

groupe en réduisant l'activité de l'eau dans le mélange de solvants, ce qui permet ainsi de déshydrater les groupes hydrophiles de molécules de protéines en provoquant la précipitation de ces protéines.

5 Dans une troisième forme de réalisation de l'invention on utilise l'adjonction de certains agents tels que par exemple des ions métalliques, de petits anions et polyanions (polyphosphates etc...) tendant à provoquer une précipitation par un mécanisme apparemment différent grâce
10 auquel les charges électrostatiques d'un petit nombre de groupes critiques de protéines semblent affectées. Comme l'ionisation de ces groupes critiques est nécessaire pour maintenir l'état normal d'hydratation des molécules de protéines, la précipitation est souvent produite par simple effet de compensation de la
15 charge électrique résultante des molécules de protéines. Ces agents ne sont nécessaires que pour des concentrations faibles et bien définies, car le mécanisme n'est pas un effet de masse. L'électrodialyse permet d'obtenir ce résultat de manière parfaitement bien contrôlée.

20 L'art antérieur utilise l'adjonction
en masse de ces agents, ce qui provoque de forts effets loca-
lisés. Avec l'électrodialyse toutes les formes de réalisatiinn
de l'invention décrites ci-dessus peuvent se traiter facilement
et l'on peut contrôler facilement le fractionnement ou même
25 dans certains cas le renforcer.

Plus précisément certaines formes de réalisation de l'invention mettent en oeuvre des processus de fractionnement de mélanges de protéines liquides contenant un ou 30 plusieurs sels dissous, en utilisant un appareil d'électrodialyse (ED) comportant une ou plusieurs paires de chambres de réception ou de dilution de sel séparées les unes des autres par des membranes sélectives aux ions, des membranes neutres (non sélectives) ou des combinaisons de membranes neutres et sélectives aux ions.

35 Dans une forme particulière de réalisati-
tion de l'invention, le courant électrique est appliqué entre les
électrodes terminales de manière à réduire la teneur en sel
d'un mélange de protéines localisé dans les chambres de dilution
de sel, par transfert des sels de ces chambres aux chambres de
40 réception adjacentes. Ce dessalage se poursuit jusqu'à ce qu'on

obtienne la précipitation.

La précipitation peut être facilitée, si on le désire, par des modifications préalables, simultanées ou ultérieures du pH et/ou de la température. Le mélange de protéines complètement dessalé des chambres de dilution est collecté et traité pour en séparer ou en retirer un ou plusieurs des éléments de protéines provoquant la précipitation. On peut ensuite faire passer facultativement le mélange de protéines dessalé dans les chambres de réception de sel de façon que les sels pénétrant dans ces chambres en provenance des chambres de dilution adjacentes restituent essentiellement au mélange de protéines dessalé sa teneur initiale en sel et en eau. Ce retour à la norme est souhaitable si le mélange de protéines est du plasma sanguin qu'on souhaite restituer au donneur.

Le processus décrit ci-dessus est particulièrement efficace lorsque le mélange de protéines liquides est du plasma sanguin ou du sérum, lorsque les éléments de protéines éliminés sont des globulines et/ou leurs composés, et lorsqu'au moins l'une des membranes de chaque paire est sélective aux ions.

Un autre procédé de mise en oeuvre de la forme de réalisation décrite ci-dessus, dans laquelle l'une au moins des membranes de chaque paire est sélective aux ions, consiste à collecter le mélange de protéines dessalé en provenance des chambres de dilution de la colonne d'électrodialyse (ED), à retirer du mélange de protéines dessalé l'une ou plusieurs des protéines précipitées, et à recycler ensuite le mélange dessalé et vidé de ses protéines, vers les chambres de dilution initiales. On applique un courant continu de polarité telle que les chambres de dilution initiales, contenant maintenant un mélange dessalé, deviennent des chambres de concentration ou de réception de sel, et que les premières chambres de réception contenant les sels retirés dans la première partie du processus, deviennent des chambres de dilution ou de déconcentration de sel, de manière à reconstituer ainsi la teneur initiale en sel et en eau du mélange de protéines dessalé.

Dans une autre forme de réalisation de l'invention, le précipité peut être provoqué par une saturation en sel, c'est-à-dire par l'adjonction, dans le mélange de protéines, d'un agent de saturation en sel. Ces agents de satu-

saturation comprennent par exemple les sulfates (Na_2SO_4 , K_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Mg SO_4 etc...) les acétates (de sodium, de potassium etc...) les citrates (de sodium, de potassium, etc...) les chlorures (Na Cl , K Cl , Mg Cl_2 , Ca Cl_2 , Al Cl_3) et autres 5 sels solubles essentiellement non toxiques.

L'appareil d'électrodialyse utilisé est le même que celui du premier cas décrit ci-dessus ; le mélange de protéines enrichi en sel, dans lequel la précipitation s'est produite sous l'action de la saturation en sel provoquée par un 10 agent de saturation tel que Na_2SO_4 par exemple, est collecté et traité pour en séparer et en retirer l'un ou plusieurs des éléments de protéines provoquant le précipité. Le courant d'apport de sel (dessalage) doit contenir un agent de saturation en sel, ou encore du plasma enrichi en sel obtenu après élimination 15 du précipité.

On peut ainsi réaliser exactement en même temps les deux opérations, c'est-à-dire le retrait de l'agent de précipitation ou de saturation en sel, et l'ajonction de cet agent pour provoquer la saturation. Le courant de protéines des- 20 salé peut alors être renvoyé à la source, éventuellement après qu'on ait obtenu l'équilibre de l'électrolyte à sa teneur initiale exacte en sel et en eau.

Le processus de saturation en sel décrit ci-dessus s'applique particulièrement bien au cas où le 25 mélange de protéines liquides est du plasma sanguin ou du sérum, et où les éléments de protéines retirés sont des -globulines et/ou leurs composés complexes. L'électrodialyse (ED) permet d'ajouter l'agent de précipitation à vitesse contrôlée, ce qui constitue un facteur très important. Une adjonction lente de 30 l'agent de précipitation conduit à la formation de précipités de protéines cristallisés beaucoup plus purs en protéines, ces cristaux contenant beaucoup moins de polluants absorbés que dans le cas des flocons de protéines plus fins, précipités par adjonction rapide de l'agent de précipitation, celui-ci pouvant 35 contenir des protéines qui ne précipiteraient pas en cas d'ajonction lente.

Dans une autre forme encore de réalisation de l'invention, la précipitation peut être produite par modification du pH par électrodialyse (ED) pour amener pratiquement ce pH au point isoélectrique (pI) d'un groupe donné de 40

protéines tel que par exemple les γ -globulines dans le cas du plasma sanguin. La saturation de sel peut se faire pour une concentration en sel plus faible si l'on travaille au voisinage du point isoélectrique de la protéine. La précipitation par dessalage peut se faire pour une concentration en sel plus élevée si l'on travaille au voisinage du point isoélectrique.

Dans une autre forme encore de réalisation de l'invention le fractionnement des protéines peut également se faire par adjonction de glycinate de zinc par exemple (concentration finale d'environ 20 mM) à un pH d'environ 7,2, par électrodialyse (ED). L'ion zinc (Zn^{++}) produit la précipitation, dans le plasma, des diverses protéines (γ -globulines, fibrinogène etc...) sans entraîner la disparition de l'albumine. Ce procédé est semblable à celui de la saturation saline décrit ci-dessus en ce que le compartiment de dilution est vidé de sel de zinc et en ce que le compartiment de concentration contenant le mélange de protéines est enrichi de manière à produire la précipitation.

La quantité de Zn^{++} nécessaire est très faible comparativement à beaucoup d'autres agents de saturation saline, car le mécanisme de précipitation consiste apparemment à compenser simplement la charge électrique négative globale de la molécule ; l'équilibre des charges des groupes d'ions restant se trouvant à zéro, la molécule de protéine essentiellement neutre n'est apparemment pas capable de retenir suffisamment d'eau pour rester en solution.

Certaines des techniques et formes de réalisation décrites ci-dessus peuvent se combiner comme cela apparaîtra à l'évidence aux spécialistes de la question. Par exemple, dans la séparation de certaines γ -globulines du plasma, l'adjonction directe de l'agent de saturation saline peut être considéré comme une combinaison avec l'électrodialyse pour retirer le sel ajouté afin de retrouver une solution relativement riche en albumine (après élimination du précipité de globuline).

Dans les exemples ci-dessus, le Na_2SO_4 est utilisé de préférence comme agent de précipitation saline, sans que cela constitue en aucun cas une limitation de l'invention, d'autres sels ainsi que des mélanges de ceux-ci pouvant être utilisés pour effectuer le processus de fractionnement.

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

- la figure 1 représente une première forme de réalisation du procédé et de l'appareil de fractionnement par dessalage selon l'invention,
- la figure 2 représente une seconde forme de réalisation du procédé et de l'appareil de fractionnement par dessalage selon l'invention, dans laquelle les mêmes 10 parties que celles de la figure 1 sont repérées par les mêmes références,
- la figure 3 représente une première forme de réalisation du procédé et de l'appareil de fractionnement par saturation saline selon l'invention,
- la figure 4 représente une seconde forme de réalisation du procédé et de l'appareil de fractionnement par saturation saline selon l'invention,
- la figure 5 est un diagramme comparant les résultats obtenus par les différents procédés 20 d'adjonction d'électrolyte Na_2SO_4 , et
- la figure 6 représente une colonne d'électrodialyse fonctionnant en courant alternatif.

L'électrodialyse (ED) est très largement utilisée pour le dessalage de solutions aqueuses : eau 25 saumâtre, petit-lait (Brevets USA n° 3.433.726, 3.447.939, 3.595.766, 3.757.005, 3.754.650 etc...). Ces brevets ne concernent que la réduction de la teneur en sel d'un liquide, et non pas l'utilisation du processus d'électrodialyse dans un procédé de fractionnement complexe suivi d'un rééquilibrage de la teneur 30 en sel et en eau d'un mélange de protéines destiné par exemple à une application thérapeutique en cas de plasmaphorèse.

Le dessalage par la technologie de la colonne d'échange d'ions a été utilisé dans le passé pour provoquer la précipitation et par conséquent le fractionnement 35 des protéines du plasma (brevets USA n° 3.234.199 et 3.073.744). Ce procédé présente cependant une souplesse limitée et les colonnes sont difficiles à manipuler, à nettoyer et à stériliser lorsqu'on les utilise dans les conditions nécessaires pour obtenir le fractionnement des protéines.

utiliser l'électrodialyse non seulement pour le fractionnement des protéines par dessalage, mais également pour mettre en œuvre le processus de saturation saline et pour obtenir le rétablissement de l'équilibre entre l'électrolyte (sel) et l'eau 5 dans les mélanges de protéines traités. Les protéines ainsi obtenues sont prêtes à être restituées au donneur ou à un patient, avec les sels initiaux.

La combinaison des techniques décrites ici comprend comme étapes essentielles l'électrodialyse du 10 mélange de protéines, (éventuellement combinée à une modification de la température et du pH), et la séparation d'un certain nombre de protéines précipitées, puis un rétablissement facultatif de l'équilibre en sel et en eau du mélange initial. Ce nouveau procédé augmente le rendement de chaque étape de manière 15 tout à fait inattendue et rend le processus extrêmement intéressant, en particulier pour des applications thérapeutiques *in situ*, en temps réel, consistant à effectuer une plasmaphorèse sur des patients pour lesquels il faut éliminer les globulines ou leurs composés tout en restituant exactement le plasma 20 initial. Ce procédé permet non seulement d'éviter la nécessité de remplacer l'albumine et le sel, mais encore de supprimer les risques de transmission d'hépatites liés à l'injection de plasma frais ou congelé provenant d'une banque de plasma.

Un premier type de procédé et d'appareil de fractionnement par dessalage seront maintenant décrits 25 ci-après sur les figures 1 et 2 dans lesquelles les mêmes parties sont repérées par les mêmes références. Sur ces figures le fluide soumis au traitement est du plasma sanguin, mais il est évident que ce fluide peut être constitué par n'importe 30 quel autre type de mélange de protéines. Comme indiqué sur la figure 1, le sang citraté ou héparinisé 1 est ultrafiltré et/ ou centrifugé 2 pour séparer les éléments de la cellule 3 ou n'importe quel autre corps en suspension (appelés éléments formés (EF)), et le plasma restant 15 est envoyé à une colonne 35 d'électrodialyse (ED) 4 telle que celle vendue par Ionics, Inc. Watertown, MA. Ces équipements d'électrodialyse et leur mode de mise en œuvre sont décrits plus complètement dans les brevets USA n° 2.848.403, 2.863.813, 3.003.940, 3.341.441, 4.115.225 et autres.

une ou plusieurs paires de chambres de concentration et de dilution séparées par des membranes alternées d'échange d'anions et de cations. Les membranes sélectives aux ions peuvent également être remplacées, dans certaines conditions, par des membranes essentiellement neutres électriquement. Ainsi la membrane d'anion peut être remplacée par une membrane neutre si l'on peut tolérer un rendement de courant réduit pour le transfert des ions. Les chambres sont situées entre l'anode (+) et une cathode (-). On fait de préférence passer une solution d'électrolyte dans les chambres de cathode et d'anode pour assurer la conduction du courant à travers les chambres de concentration et de dilution. Le courant électrique passe jusqu'à ce qu'on obtienne au moins un début de précipitation, ou jusqu'à ce que cette précipitation soit obtenue lorsqu'on réduit la température et/ou lorsqu'on règle le pH à la valeur de pI de la dernière protéine.

Généralement une chambre de concentration isole les solutions d'électrodes du produit ou des chambres de dilution. Les membranes sont généralement, mais pas nécessairement, choisies de manière à minimiser le transfert des composés à faible poids moléculaire tels que les sucres du sang. Les débits traversant la colonne et le courant électrique appliqué sont régulés de manière à éviter les changements de pH trop importants. Le plasma passe dans les chambres de dilution et l'application d'un courant continu aux bornes des électrodes permet de réduire la teneur en sel ou en ions du plasma par suite du passage du sel dans les chambres de concentration adjacentes (comme indiqué par les flèches verticales de la colonne), ces chambres pouvant être déclenchées initialement, si on le désire, par une petite quantité de plasma ou d'albumine.

Le plasma complètement dessalé obtenu est collecté dans les chambres de dilution (non représentées) et passe des moyens permettant de séparer et de retirer une ou plusieurs protéines formant le précipité (des globulines ou leurs composés dans le cas présent). Les moyens de séparation peuvent par exemple être constitués par un échangeur de chaleur 6 conduisant à des températures plus basses, et par un appareil de réglage de pH et de centrifugation et/ou d'ultrafiltrage 7. Après avoir été séparé des globulines 17 ou autres protéines, le mélange dessalé 8 passe dans les chambres de concentration (non représentées) de la colonne d'électrodialyse 4, ce qui lui

permet ainsi de recevoir les sels provenant des chambres de dilution adjacentes (comme indiqué par les flèches verticales) et de restituer la teneur en sel initiale exacte du mélange.

Ce mélange 9 ayant retrouvé sa teneur en sel passe ensuite facultativement à travers un échangeur de chaleur 10 destiné à régler approximativement le mélange à la température du corps lorsque cela est nécessaire, puis le mélange reçoit les éléments obtenus 3 (tels que les globules rouges et blancs et les plaquettes) précédemment séparés du plasma. Ce mélange de protéines reconstitué 12 peut alors être restitué au patient 14, pratiquement sans apport extérieur d'albumine ou d'électrolyte.

Le processus est donc complètement réalisé en boucle fermée, autonome, et capable d'une mise en œuvre en temps réel, in-situ, pour des applications thérapeutiques d'échange de plasma.

Si, pendant l'électrodialyse, la température du plasma est maintenue entre environ 0° C et 40° C, si la vitesse du mélange de protéines dans les chambres de dilution est maintenue entre 3 et 40 cm/sec, et si le rapport ($\frac{CD}{K}$) de la densité de courant (CD) en mA/cm² à la conductivité K de la solution de protéines en milliSiemens/cm, est maintenu entre 0,1 et 10, le pH des protéines ne varie pratiquement pas et le précipité ainsi obtenu (même en présence d'un dessalage relativement complet) est tel qu'il permet d'éviter tout risque d'obstruction des chambres de la colonne d'électrodialyse. (On notera qu'un milli Siemens est égal à un millimho).

Une autre forme de réalisation de l'appareil et du procédé selon l'invention, est représentée sur la figure 2. Le fluide est, là encore, du plasma 1, mais peut être constitué par n'importe quel autre mélange aqueux de protéines fluides. (On peut ajouter ou ne pas ajouter du citrate ou de l'héparine pour réduire la coagulation du plasma pendant le traitement). Le plasma héparinisé ou citraté, ou non traité, est ultrafiltré ou centrifugé 2 pour retirer le précipité, puis envoyé à une colonne d'électrodialyse 4 semblable à celle décrite dans l'Exemple I. Le plasma est introduit dans les chambres de dilution (non représentées) et le passage d'un courant continu dans la colonne permet de faire passer les sels du plasma dans les chambres de concentration (comme indiqué par les flèches

verticales). Le mélange dessalé 5 provenant des chambres de dilution passe à travers l'échangeur de chaleur 6 destiné à refroidir le plasma, et le précipité obtenu 17 est séparé par un dispositif d'ultrafiltrage ou de centrifugation 7 ou par 5 tout autre dispositif analogue.

Le liquide dessalé qui surnage 8 est alors envoyé aux chambres de concentration en sel (non représentées) d'une autre colonne d'électrodialyse 18 représentée pour cette seconde électrodialyse. En pratique il peut s'agir de la 10 colonne d'électrodialyse ED initiale 4 lorsque le premier courant de concentration 19 de la colonne d'ED 4 constitue le courant de dilution. La polarité de la colonne d'ED 18 peut être inverse de celle de la colonne d'ED 4. Cette seconde étape d'ED 18 provoque le retour des sels du premier courant de concentration 19 vers le plasma dessalé, ce qui rétablit l'équilibre 15 en sel. Ce plasma rééquilibré 9 passe alors dans un échangeur de chaleur 10, puis on ajoute ensuite les cellules de sang 3. Le sang ainsi traité peut être restitué au donneur ou à tout autre patient 14.

20 EXEMPLE I -

Cet exemple illustre la restitution de l'équilibre en électrolyte et en eau d'un plasma dessalé, par utilisation de plasma frais dans le courant dilué.

L'appareil utilisé est une colonne 25 d'électrodialyse de laboratoire n'utilisant qu'une seule paire de cellules (c'est-à-dire une chambre de dilution et une chambre de concentrations définies par des membranes sélectives aux ions) situées entre des chambres d'électrodes terminales. Une solution de 0.2N.Na₂SO₄ est utilisée aux électrodes pour conduire 30 le courant continu. Un volume de 360 ml de plasma frais ou citraté est utilisé dans le courant de dilution, et un volume de 340 ml de plasma dessalé est utilisé dans le courant de concentration. La vitesse linéaire du courant de dilution est d'environ 25 cm/sec, la température est maintenue entre 15 et 20° C, et 35 les débits sont maintenus à 90 ml/min. par paire de cellules. La surface de cellule efficace est d'environ 220 cm².

Le déroulement du processus est résumé dans le tableau ci-dessous :

Ainsi le plasma dessalé a été ramené dans le courant de concentration à une valeur de conductivité comparable à celle du plasma citraté non salé initial, et l'équilibre en eau a été restitué.

15 L'équilibre EXEMPLE II -

Bien que la colonne d'électrodialyse utilisée dans l'exemple I comporte des membranes sélectives aux ions (de types anion et cation), on peut également utiliser une combinaison de membranes sélectives aux ions, avec des membranes neutres (non sélectives).

Dans cet exemple on a remplacé la membrane sélective aux anions de la colonne de l'exemple I, par une membrane neutre constituée de cellulose régénérée. On pourrait également utiliser si on le désire d'autres types de membranes neutres bien connues de l'art antérieur, telles que des membranes de type à osmose inverse ou à dialyse. Les membranes neutres présentent l'inconvénient de ne pas être aussi efficaces que les membranes sélectives aux ions. Cependant ces membranes sont très intéressantes à utiliser dans les processus où le niveau d'énergie d'entrée n'est pas une caractéristique importante.

35 Dans cet exemple la colonne contenant la membrane de cellulose régénérée fonctionne avec les mêmes solutions et dans les mêmes conditions que celles de l'exemple I.

Le déroulement du processus est résumé dans le tableau ci-dessous :

CD/K	Temps (min)	Amp.	Courant de dilution (plasma frais)			Courant de concentration (plasma dessalé)		
			Conducti- vité (K)	pH	Vol.	Conducti- vité (K)	pH	Vol.
5	3,3	0	12,0	16,500	8,2	360	0,050	5,3
	3,3	14	6,2	8,700	7,4	350	8,480	7,4
	3,3	27	3,1	4,300	6,9	342	12,390	7,7
	3,3	57	0,6	0,830	6,1	337	15,450	8,0
	23,3	80	0,2	0,039	5,2	334	16,420	8,2
10								

Ici encore on a ramené le plasma dessalé à une conductivité comparable à celle du plasma frais initial et l'on a restitué l'équilibre en eau. On remarquera que l'augmentation du temps de fonctionnement (80 minutes) est due au fait que le rendement du courant est considérablement plus petit pour la combinaison des membranes neutres et des membranes d'échange de cations.

EXEMPLE III -

Cet exemple est semblable à l'exemple I sauf le fait que le plasma dessalé est utilisé dans le courant de dilution initial de l'exemple I et qu'une solution aqueuse contenant les sels retirés par une première étape de dessalage, est utilisée dans le courant de concentration initial. La polarité du courant est inversée (ce qui transforme ainsi les chambres de concentration initiales en chambres de dilution et les chambres de dilution initiales en chambres de concentrations) et les sels provenant du courant d'eau salée sont transférés au plasma dessalé (qui constitue maintenant le courant de concentration) pour ramener les sels du plasma à leur concentration initiale.

EXEMPLE IV -

Cet exemple illustre l'extraction des immunoglobulines Ig en fonction du degré de dessalage.

On utilise l'appareil de l'exemple I avec 200 ml de plasma humain héparinisé dans la chambre de dilution. La température est comprise entre 10 et 26° C et la valeur de CD/K est d'environ $4 \frac{\text{mA/cm}^2}{\text{mS/cm}}$.

On utilise une vitesse de fluide de 25 cm/sec. Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus

et montre qu'environ 50 % des Ig totales sont extraites tandis que l'extraction d'albumine n'est pratiquement pas altérée après un dessalage de 99,7 %.

5

Protéines restant dans le liquide qui surnage
(mg/100 ml)

	Temps (min)	pH	Conduc- tivité	% Des- salage	IgG	IgA	IgM	Albumine
10	0	7,55	15,280	0	820	115	72	4.410
	0	7,55	13,720	0	750	85	50	3.900
	5	7,35	7,020	48,80	780	80	46	3.900
	8	7,10	3,710	72,96	700	75	36	3.900
	10	6,55	1,310	90,60	630	75	24	4.100
	13	5,40	0,447	96,70	570	55	12	4.000
15	15	5,20	0,190	98,60	450	50	10	4.000
	17	4,90	0,047	*99,70	410	40	16	3.900
	19	5,00	0,028	99,80	410	45	12	3.800
	20	5,10	0,022	99,84	410	45	10	1.800

20

* Somme de % d'Ig extraite après 99,7 % de dessalage

		% extrait	% extrait (corrigé pour le transfert d'eau)
25	Ig G =	45,3	46,7
	Ig A =	52,9	55,9
	Ig M =	68,0	71,4
	Total d'Ig =	47,3	49,7

EXAMPLE V -

30

Cet exemple illustre une autre forme encore de réalisation de l'invention dans laquelle la variation du pH jusqu'au point isoélectrique d'une protéine qu'on désire extraire, permet d'aider sa précipitation. La poursuite du dessalage du plasma provenant de l'exemple IV abaisse le pH jusqu'au point isoélectrique pI de l'albumine (environ 4,9) ce qui produit ainsi sa précipitation. L'albumine précipitée est séparée par filtrage puis remise en suspension par adjonction de sel. Cette adjonction se fait par électrodialyse en utilisant le matériau riche en albumine comme courant de concentration en sel, ce qui donne une solution d'albumine isotonique de 3 à

40

5 %. Cette albumine est pratiquement exempte d'immunoglobulines et de leurs composés, et peut servir à étendre le plasma. C'est alors le meilleur procédé à utiliser lorsqu'on veut extraire 40 à 50 % d'immunoglobulines pour effectuer une "immunophorèse" (extraction d'immunoglobulines) en cas de troubles d'autoimmunologie.

Dans une autre forme de réalisation de l'invention, le fractionnement est obtenu par "saturation saline" c'est-à-dire par utilisation de sels tels que $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 etc ... injectés dans le mélange de protéines par électrodialyse. Les différentes protéines précipitent à des concentrations salines différentes ce qui les conduit d'elles-mêmes à un fractionnement. Un avantage particulier de cette utilisation de l'électrodialyse à la place de l'adjonction directe de sels, est que l'électrodialyse permet de mieux contrôler l'adjonction de sels et d'éviter ainsi les gradients de concentration locaux. La "saturation saline" par électrodialyse est également beaucoup plus rapide que celle obtenue par une dialyse seule dans laquelle le seul mécanisme d'entraînement est la diffusion (sans différence de potentiel électrique). On obtient par électrodialyse un fractionnement comparable à celui obtenu par adjonction de sel ou par dialyse, mais pour des concentrations salines beaucoup plus faibles.

On décrira maintenant un procédé et un appareil de saturation saline utilisés, selon l'invention, pour le fractionnement du plasma sanguin, mais il est évident que l'invention ne se limite pas seulement au plasma.

Deux formes de réalisation de "saturation saline" sont représentées sur les figures 3 et 4. Comme indiqué sur la figure 3, le plasma frais 15 est pompé comme courant de concentration (courant de réception de sel), par deux colonnes d'électrodialyse 4 et 11. Le plasma saturé de sel obtenu 22 passe dans des moyens de séparation 7, centrifuges par exemple, permettant de retirer les protéines précipitées 17. Le liquide qui surnage 8 et qui devient le courant de dilution de la colonne d'électrodialyse 11 est essentiellement un filtrat d'albumine contenant l'agent de saturation saline (tel que Na_2SO_4 par exemple) dont on a retiré une fraction 17 de protéines précipitées (telles que des immunoglobulines et du fibrinogène par exemple).

Ce courant est conçu pour libérer son sel (voir le sens des flèches verticales) lorsqu'un courant est appliqué aux bornes de la colonne d'électrodialyse, c'est-à-dire pour transférer son agent de saturation saline à un courant de plasma frais 15 en provoquant ainsi la précipitation de certaines protéines (globulines) de ce courant de plasma frais. A son tour ce courant dilué 8 s'appauvrit en sel et tend vers une simple solution d'albumine. La colonne d'électrodialyse finale ou de finition 4 est représentée séparément mais peut 10 être constituée par une partie d'une colonne d'électrodialyse unique. Cette étape de finition peut ne pas être nécessaire lorsque le produit 9 peut contenir des sels ne gênant pas la fusion. Un électrolyte de finition 20 peut être nécessaire s'il faut mettre en oeuvre l'étape d'électrodialyse de finition. Ce 15 procédé est donc compatible avec une mise en oeuvre in-situ pour un échange de plasma thérapeutique, et peut se mettre en oeuvre non seulement par fournées successives mais également en régime continu.

Une autre variante de réalisation de 20 saturation saline selon l'invention est représentée sur la figure 4. Dans cette dernière variante l'agent de saturation saline (solution de sel) est ajouté directement au plasma 15 pour provoquer la précipitation des immuno~~g~~lobulines qu'on peut ainsi séparer 7 et extraire 17 par filtrage par exemple. Le 25 plasma 16 obtenu, utilisé comme courant de dilution, est dessalé par la colonne d'électrodialyse 4 ; le courant de concentration 18 devenant essentiellement une solution d'agent de saturation saline. Cette solution concentrée 19 peut être ajoutée directement, en boucle fermée, au plasma frais 15. Des électrolytes 20 30 et les éléments obtenus 3 peuvent être ajoutés à la solution d'albumine dessalée 9 avant que la solution 12 soit de nouveau administrée au donneur ou au patient 14. Bien qu'on préfère utiliser du Na_2SO_4 comme agent de saturation saline, il est évident que l'invention ne se limite pas à ce seul agent. On 35 peut en effet utiliser d'autres sels ou leurs mélanges tels que K_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, le citrate de sodium, les phosphates, NaCl , KC1 , les acétates etc... et leurs mélanges. La quantité de sel ajoutée dépend évidemment du fractionnement voulu. L'exemple ci-après illustre la séparation entre l'Ig G et 40 l'albumine.

EXEMPLE VI -

On chauffe 300 ml de plasma à 28 à 37° C et une solution saturée de Na_2SO_4 (environ 6 N) à 28 à 37° C est ajoutée à la vitesse de 10 à 15 ml/min en agitant 5 rapidement et en permanence le mélange de plasma. La quantité d'albumine et de globulines (IgG) restant dans le liquide qui surnage, se détermine, pendant l'ajonction de sel, en fonction de la concentration en sel (électrolyte) du liquide qui surnage.

La figure 5 compare les résultats 10 obtenus par les divers procédés d'ajonction d'électrolyte Na_2SO_4 , et représente le fractionnement approximatif des protéines (albumine et IgG) pour différentes forces d'électrolyte. La figure 5 représente aussi en particulier la courbe obtenue lorsqu'on utilise un mélange de sels (6 N NaCl et 15 6 N Na_2SO_4).

Enfin la figure 5 représente également la comparaison entre les saturations salines obtenues par électrodialyse, par dialyse et par adjonction directe de sel.

Les résultats montrent que pour 20 obtenir une extraction d'environ 80 % de globulines IgG dans le plasma frais, il faut utiliser une concentration de sel (Na_2SO_4) de 1,8 N dans le plasma (surnageant) lorsqu'on se trouve dans le cas de l'ajonction directe de sel. Dans ces conditions cependant, on obtient simultanément une extraction (c'est-à-dire une perte) d'environ 15 % d'albumine.

Lorsque, dans le cas de l'ajonction directe de sel, on utilise un mélange de sel ($\text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{NaCl}$), une extraction de globulines de 80 % est obtenue pour une teneur en sel d'environ 2,05 fois la normale, avec une extraction 30 d'albumine limitée à 5 % seulement. Lorsque l'ajonction de sel (Na_2SO_4) se fait par dialyse on obtient une extraction de globulines de 80 % pour une teneur en sel de l'ordre de 2,3 fois la normale, mais avec une perte d'albumine d'environ 10 %. Si l'on compare à l'ajonction de sel par électrodialyse ED on peut remarquer qu'on obtient une extraction de globulines de 35 95 % pour une teneur en sel beaucoup plus proche de la normale (1,2 N), avec une perte d'albumine de moins de 15 %. En résumé il apparaît que l'ajonction de sel par électrodialyse permet une extraction de globulines plus complète avec moins de pertes d'albumine et pour des teneurs en sel plus faibles. Une variante 40

de procédé peut consister, si on le désire, à utiliser une combinaison de l'adjonction directe de sel ou de la dialyse de l'agent de saturation saline, suivie d'un traitement par électrodialyse pour retirer les sels ajoutés.

5 EXEMPLE VII -

Cet exemple illustre la séparation du facteur antihémophile (AHF) et du fibrinogène par rapport au plasma. Comme l'activité du AHF est sensible à la durée et à la température, la séparation se fait à basse température (4° C).
10 Un procédé applicable à la séparation consiste à abaisser la force ionique du plasma, de préférence par électrodialyse de dessalage, pour provoquer la précipitation (séparation) du fibrinogène et de l'AHF, puis à redissoudre le précipité dans par exemple 0,15 N de Na Cl, et à soumettre une nouvelle fois le
15 liquide redissous à une électrodialyse pour abaisser la force ionique et provoquer ainsi la précipitation (et la séparation) de l'AHF par rapport au fibrinogène. Dans une variante de réalisation, la dernière séparation peut être produite, après redissolution, par absorption spécifique d'AHF sur la colonne
20 d'échange d'anions, ou par des techniques de perméabilisation par gel.

Un second procédé consiste à saturer directement l'AHF de sel avec une force appropriée. Tous ces procédés peuvent aussi bien s'appliquer en série que coup par coup, comme dans le cas de l'immunophorèse.
25

Une autre forme de réalisation de l'invention consiste à appliquer l'électrodialyse au fractionnement des protéines du plasma en utilisant de petites quantités d'ions métalliques lourds à faible toxicité tels que le diglycinate de zinc, utilisés comme agents de précipitation.
30 Le plasma est tout d'abord partiellement électrodialysé pour éliminer les facteurs de coagulation qui précipitent pendant le dessalage. Après extraction de ces facteurs, le liquide restant qui surnage passe dans les compartiments de concentration en sel d'une colonne d'électrodialyse contenant du diglycinate de zinc dans les compartiments de dilution. Par application d'une différence de potentiel électrique on peut transférer une quantité contrôlée de diglycinate de zinc dans les compartiments de concentration pour obtenir une force ionique d'environ 0,1 de la normale, dans le liquide qui surnage.
35
40

Le fonctionnement se fait entre 0 et 4° C environ et pour un pH d'environ 7,0 à 7,2. Il en résulte la formation d'un précipité constitué essentiellement par des globulines, avec un liquide surnageant riche en albumine. Ce liquide surnageant peut être 5 clarifié du zinc ajouté par électrodialyse de dessalage, après qu'on ait descendu le pH à 5,1 ou 5,8 environ par adjonction convenable d'un produit tampon.

On peut également substituer du chlorure d'aluminium au diglycinate de zinc, pour fractionner 10 par précipitation toutes les protéines sauf les γ -globulines. L'addition directe d'un égal volume de 0,1 M de $AlCl_3$, à 0° C au plasma, avec une agitation rapide, provoque un précipité de toutes les autres protéines qui peuvent alors se redissoudre dans 0,15 N de NaCl.

15 **EXEMPLE VIII -**

Cet exemple illustre l'utilisation du courant alternatif plutôt que du courant continu normalement utilisé dans les opérations d'électrodialyse. La colonne d'électrodialyse utilise ainsi une combinaison de membranes neutres 20 (N) et de membranes sélectives aux cations (C) dans la disposition illustrée sur la figure 6. Une colonne d'électrodialyse fonctionnant en courant alternatif est décrite en détail dans le brevet USA n° 2.955.999 (C.E. Tirrell).

Une valve métallique en niobium 4 plaqué d'un métal noble tel que du platine 5, est utilisée comme anode 1, et une valve métallique 6 sans revêtement de métal noble, est utilisée comme cathode 3. Les valves métalliques ont la propriété de ne conduire le courant que lorsqu'elles sont cathodiques ce qui donne ainsi une sorte de "redressement" du courant alternatif (A/C). Une telle colonne d'électrodialyse utilise deux paires de cellules (au lieu d'une seule paire comme dans l'exemple II) séparées par une électrode médiane bipolaire 2 plaquée de platine 5 d'un côté, pour servir d'anode.

35 Pendant la demi-période positive (+) du courant, le côté plaqué de platine 5 de l'électrode 1 sert d'anode, et le côté non plaqué de platine 4 de l'électrode 2 sert de cathode, de sorte que la colonne de membranes limitée par les électrodes 1 et 2 se trouve en service tandis que la colonne de membranes comprise entre les électrodes 2 et 3

est inactive du fait que l'électrode 3 non plaquée de platine ne peut fonctionner en anode.

5 Pendant la demi-période négative (-) c'est la colonne comprise entre les électrodes 2 et 3 qui fonctionne car le côté plaqué de platine 5 de l'électrode 2 sert d'anode.

10 Une telle colonne d'électrodialyse fonctionne de la même façon que dans le cas de l'exemple II mais présente l'avantage de pouvoir être alimentée en courant alternatif sans nécessiter de redresseur. La membrane neutre peut également être remplacée par une membrane sélective aux anions, de manière à augmenter le rendement de fonctionnement.

EXEMPLE IX -

15 Cet exemple illustre l'extraction du Facteur VIII du plasma humain par électrodialyse de dessalage. L'appareil de séparation à membrane qu'on utilise est une colonne d'électrodialyse Dial - A - Cell T.M. vendue par Ionics, Inc. Watertown, Mass. et décrite en détail dans le brevet USA n° 4.202. 772.

20 La colonne comprend deux paires de cellules présentant une surface de membrane effective de 13,6 cm². Les membranes d'échange d'ions utilisés sont de type sélectives aux cations (CR 61 CSL) et sélectives aux anions (AR 103 QZL), ces deux type étant vendus par Ionics, Inc.

25 On utilise dans ce processus 300 ml de plasma frais contenant de l'ACD (solution anticoagulante constituée par un mélange de citrate de sodium, d'acide citrique et de dextrose). Le plasma de départ présente une activité de Facteur VIII d'environ 78 % de la normale.

30 Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus par l'opération de dessalage. Lorsque le plasma est dessalé, le Facteur VIII précipite et se trouve donc éliminé du liquide qui surnage. Pour un niveau de dessalage d'environ 90 % le liquide qui surnage retient environ 5 à 10 % de Facteur VIII et le précipité retiré contient donc 90 à 95 % du Facteur VIII initialement contenu dans l'échantillon de plasma initial.

Temps (min)	Conductivité (K)	% de dessalage	Activité du Facteur VIII dans le liquide qui surnage (% ou normal)
5 0	13,6	0	78
12	11,6	14,7	70
18	8,4	38,2	63
24	6,4	52,9	42
30	3,6	47,6	30
10 33	2,8	79,4	9
36	2,2	83,8	12
39	1,8	86,8	5
42	1,0	92,6	11

Le traitement du petit-lait permettant
 15 d'augmenter la teneur en protéines et de réduire les résidus
 (sel) et le lactose, a fait l'objet d'une grande variété de
 procédés. L.H. Francis décrit, dans le brevet USA n° 3.615.664,
 une technique dans laquelle on retire le lactose du petit-lait
 par concentration du petit-lait brut en lactose cristallisé,
 20 puis par électrodialyse du liquide qui surnage pour obtenir
 une déminéralisation. Le même inventeur décrit, dans le brevet
 USA n° 3.447.930, un autre procédé dans lequel on commence par
 effectuer une déminéralisation suivie ensuite d'une élimination
 du lactose.

25 Ces divers procédés et autres procédés
 de l'art antérieur ont pour but d'atteindre comme produit final
 du petit-lait hautement raffiné à forte teneur en protéines.

Les principaux problèmes posés par la
 mise en oeuvre de ces procédés sont la dénaturation des protéines
 30 du petit-lait (lactalbumine) pendant le chauffage nécessaire à
 la concentration, et la cristallisation. Le procédé selon l'in-
 vention permet de résoudre ces problèmes en saturant de sel les
 protéines du petit-lait, puis en séparant et en retirant les
 protéines précipitées par centrifugation ou filtrage, le sel
 35 étant ensuite retiré du liquide qui surnage. Ce liquide qui
 surnage contient essentiellement du lactose et peut donc être
 soumis à des températures élevées sans crainte de dénaturation
 des protéines. On remarquera que ce procédé permet non seule-
 ment de séparer les protéines mais aussi d'effectuer un dessalage
 40 par les processus décrits dans les exemples ci-dessus relatifs

au traitement des protéines du plasma.

EXEMPLE X -

L'appareil d'électrodialyse utilisé est semblable à celui décrit dans l'exemple I. Le courant de dilution est constitué de 500 ml de liquide surnageant obtenu par un premier traitement du petit-lait dans lequel pratiquement toutes les protéines de celui-ci sont retirées c'est-à-dire saturées de sel par électrodialyse, avec une teneur en sulfate de sodium de l'ordre de 3,5 fois la normale, et une température d'environ 38° C.

On utilise comme courant de concentration 300 ml de petit-lait concentré avec une teneur en solides de 22,5 % (solides : 12 % de protéines, 80 % d'hydrate de lactose et environ 8 % de résidus).

Une densité de courant continu d'environ 130 ASF est utilisée au départ (CD/K de départ = 2), puis, à la fin du processus, lorsque le liquide de dilution est exempt de la plupart de ses sels, le courant électrique est réglé de manière à correspondre à un CD/K d'environ 4,8.

L'opération se poursuit jusqu'à ce qu'on obtienne une teneur en $Na_2 SO_4$ d'environ 3,5 fois la normale dans le courant de concentration où la conductivité est d'environ 95 milli Siemens/cm.

Le volume du courant de dilution qui se trouve réduit à environ 300 ml est vidé de sel à 90 % et peut ensuite être de nouveau traité pour récupérer son lactose. Le courant de concentration dont le volume augmente à environ 500 ml forme un fin précipité de protéines qu'on retire par centrifugation. Le liquide à forte teneur en sel qui surnage est alors utilisé comme courant de dilution pour transférer son agent de saturation saline à une fournée suivante de petit-lait concentré. Ce procédé de transfert de l'agent de saturation saline se met en oeuvre de la même manière que dans les cas décrits ci-dessus de séparation des protéines du plasma humain.

REVENDICATIONS

1.- Procédé de fractionnement de mélanges de protéines liquides conforme au brevet principal suivant lequel on sépare un mélange aqueux de protéines (1) en fractions de compositions intrinsèquement différentes, procédé caractérisé en ce qu'il consiste à retirer tout le précipité troubant le mélange aqueux (1) ; à faire passer ensuite ce mélange à une vitesse de l'ordre de 3 à 40 cm/sec. dans un appareil d'électrodialyse (4) contenant au moins une paire de membranes voisines définissant entre elles une chambre de débit de liquide ; à appliquer un courant électrique dans cet appareil avec un rapport $\frac{CD}{K}$ d'environ 0,1 à 10 (CD étant la densité de courant en mA/cm² et K la conductivité du mélange aqueux en milli Siemens/cm) pour modifier ainsi l'environnement ionique du mélange d'une valeur suffisante pour déstabiliser au moins partiellement une ou plusieurs protéines du mélange ; à laisser précipiter la protéine déstabilisée ; et à retirer ensuite (6, 7) tout le précipité obtenu (17) en maintenant la température du mélange dans une plage de l'ordre de 0 à 40° C pendant toute l'opération de séparation.

2.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'environnement ionique du mélange (1) se modifie en changeant sa concentration ionique d'au moins 10 % environ.

3.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que l'environnement ionique du mélange (1) se modifie en changeant son pH pour l'amener exactement au point isoélectrique de l'une au moins des protéines.

4.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les membranes de l'appareil d'électrodialyse (4) sont non sélectives aux ions.

5.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'une au moins des membranes de paires contigües est sélective aux ions.

6.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'une des membranes de paires contigües est sélectives aux cations.

7.- Procédé selon l'une quelconque

des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'une des membranes de paires contigües est sélective aux cations, l'autre membrane étant sélective aux anions.

5 8.- Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'une partie importante au moins du courant électrique est du courant continu.

9.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 et 7, caractérisé en ce que le courant électrique est du courant alternatif.

10 10.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'environnement ionique du mélange (1) se modifie essentiellement en augmentant la concentration en ions non monovalents.

15 11.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'environnement ionique du mélange (1) se modifie essentiellement en augmentant à la fois la concentration en ions monovalents et en ions non monovalents.

20 12.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que le précipité retiré est ensuite redissous.

25 13.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que le précipité retiré est au moins en partie redissous, et en ce que cette partie redissoute est transformée en une fraction de précipité insoluble et une fraction de précipité pouvant se redissoudre en modifiant de nouveau l'environnement ionique par électrodialyse, la fraction insoluble et la fraction soluble étant séparées l'une de l'autre.

30 14.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que le précipité retiré est au moins en partie redissous dans l'électrolyte et en partie au moins récupéré par électrodialyse dans le mélange de protéines, la protéine redissoute étant ensuite séparée en deux éléments au moins intrinsèquement distincts.

35 15.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que le mélange de protéines aqueux comprend des protéines de plasma, et en ce que le précipité retiré comprend du fibrinogène et un facteur antihémophile.

16.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que le mélange de protéines aqueux comprend essentiellement du plasma non dénaturé, et en ce que le précipité retiré comprend essentiellement des 5 immunoglobulines.

17.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que le mélange de protéines (1) comprend des protéines de plasma, et en ce que le précipité retiré comprend du fibrinogène et un facteur anti-10 hémophile, le précipité étant redissous et séparé en une fraction riche en fibrinogène et une fraction riche en facteur antihémophile, par mise en contact avec un matériau choisi dans un groupe comprenant des granulés de résines d'échange d'ions, des granulés de perméabilisation à un gel, et des mélanges de 15 ces granulés.

18.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que le mélange de protéines aqueux (1) comprend des protéines de plasma, et en ce que le précipité retiré comprend de l'albumine.

19.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, caractérisé en ce que le précipité retiré est redissous pour servir à étendre le plasma.

20.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le mélange de protéines aqueux comprend des protéines de plasma ; en ce que l'environnement ionique du mélange se modifie en ajoutant des 25 sels essentiellement solubles et non toxiques choisis dans un groupe comprenant les sulfates, les citrates, les phosphates, les chlorures, les acétates, les perchlorates, les nitrates, les sulfites, les thiosulfates, les bromures, les iodures, et des mélanges de ces divers sels ; et en ce que le précipité 30 obtenu, contenant essentiellement des protéines non albuminoides, est retiré du mélange.

21. - Procédé de séparation d'une 35 solution aqueuse de protéines selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, comprenant des englobulines et des pseudoglobulines à rassembler en une fraction riche en englobulines et une fraction riche en pseudoglobulines, procédé caractérisé en ce qu'il consiste à retirer tout le précipité du mélange (1) ; 40 à faire passer ce mélange dans un appareil d'électrodialyse (4)

comportant au moins une paire de membranes contigües définissant entre elles une chambre de passage de liquide ; à appliquer un courant électrique aux bornes de l'appareil (4) pour augmenter ainsi la concentration ionique du mélange à un niveau suffisant 5 pour obtenir la formation d'une phase précipitée relativement riche en englobulines et relativement pauvre en pseudoglobulines ; à retirer ensuite tout le second précipité obtenu ; à faire passer de nouveau le mélange aqueux restant (8) dans un appareil d'électrodialyse (18), à appliquer de nouveau un courant électrique aux bornes de l'appareil (18) pour augmenter encore la concentration ionique du mélange à un point suffisant pour obtenir 10 la formation d'une phase précipitée relativement pauvre en englobulines et relativement riche en pseudoglobulines ; à retirer ensuite tout le troisième précipité obtenu ; à faire passer de nouveau 15 un appareil d'électrodialyse ; et à appliquer un courant électrique aux bornes de l'appareil pour diminuer ainsi de manière importante la concentration ionique de la solution restante.

22.- Procédé de séparation d'un mélange aqueux de protéines (1) en fraction de compositions différentes, 20 selon l'une quelconque des revendications 1 à 21, procédé caractérisé en ce qu'il consiste à retirer tout le précipité (3) du mélange ; à ajouter ensuite une solution concentrée d'un sel choisi dans un groupe comprenant les sulfates, les citrates, 25 les acétates, les phosphates, les chlorures, les perchlorates, les nitrates, les thiosulfates, les sulfites, les bromures, les ionures ou des mélanges de ces sels, pour modifier ainsi l'environnement ionique du mélange à un point suffisant pour déstabiliser au moins partiellement une ou plusieurs protéines 30 du mélange ; à laisser précipiter les protéines désstabiliées ; à retirer ensuite tout le précipité obtenu (17) ; à faire passer ensuite le liquide restant qui surnage, avec une vitesse de l'ordre de 3 à 40 cm/sec., dans un appareil d'électrodialyse (4) comprenant au moins une paire de membranes contigües définissant 35 entre elles une chambre de passage de liquide ; à appliquer un courant électrique aux bornes de l'appareil avec un rapport $\frac{CD}{K}$ de l'ordre de 0,1 à 10, pour retirer les sels du mélange ; et à maintenir la température de ce mélange dans une plage de 0 à 40° C pendant l'extraction du sel.

23.- Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que l'environnement ionique du mélange se modifie en augmentant sa concentration ionique d'au moins 10 % environ.

5 24.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 22 et 23, caractérisé en ce que l'environnement ionique du mélange se modifie encore en faisant varier son pH pour l'amener exactement au point isoélectrique de l'une au moins des protéines de manière à obtenir ainsi la précipitation de cette protéine au moins,

10 25.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 22 à 24, caractérisé en ce que l'adjonction de sel concentré se fait par l'intermédiaire d'une membrane de dialyse.

15 26.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 22 à 24, caractérisé en ce que l'adjonction de sel se fait par l'intermédiaire d'une membrane non sélective aux ions.

20 27.- Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que les membranes de l'appareil d'électrodialyse sont non sélectives aux ions.

28.- Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que l'une au moins des membranes contigües d'une paire est sélective aux ions.

25 29.- Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que l'une des membranes contigües d'une paire est sélective aux cations.

30 30.- Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que l'une des membranes contigües d'une paire est sélective aux cations et en ce que l'autre membrane est sélective aux anions.

31.- Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'une partie au moins très importante du courant électrique est du courant continu.

35 32.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 29 et 30, caractérisé en ce que le courant électrique est du courant alternatif.

40 33.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 22 à 32, caractérisé en ce que les sels extraits, par l'appareil d'électrodialyse, du liquide restant

qui surnage, sont de nouveaux ajoutés à un mélange de protéines suivant pour provoquer un précipité.

34.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 22 à 33, caractérisé en ce que le mélange aqueux de protéines comprend des protéines de plasma, et en ce que le précipité extrait comprend du fibrinogène et un facteur antihémophile.

35.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 22 à 34, caractérisé en ce que le mélange aqueux de protéines comprend essentiellement des protéines de plasma non dénaturées et en ce que le précipité extrait comprend des immunoglobulines.

36.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 22 à 35, caractérisé en ce que le mélange aqueux de protéines comprend des protéines de plasma et en ce que le précipité extrait par électrodialyse est essentiellement de l'albumine avec un faible pourcentage de sels.

37.- Procédé selon la revendication 36, caractérisé en ce que le produit final obtenu par électrodialyse est de l'albumine pratiquement exempte de sel.

38.- Procédé selon la revendication 37, caractérisé en ce qu'on ajoute du sel provenant d'une source extérieure, à l'albumine exempte de sel, pour obtenir un équilibre d'électrolyte convenable propre à des applications intraveineuses.

39.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 38, caractérisé en ce que le mélange aqueux de protéines est constitué par du petit-lait.

40.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 38, caractérisé en ce que le mélange aqueux de protéines comprend des protéines de plasma et en ce que le précipité extrait comprend un facteur antihémophile.

SOLUTION ANTICOAGULANTE

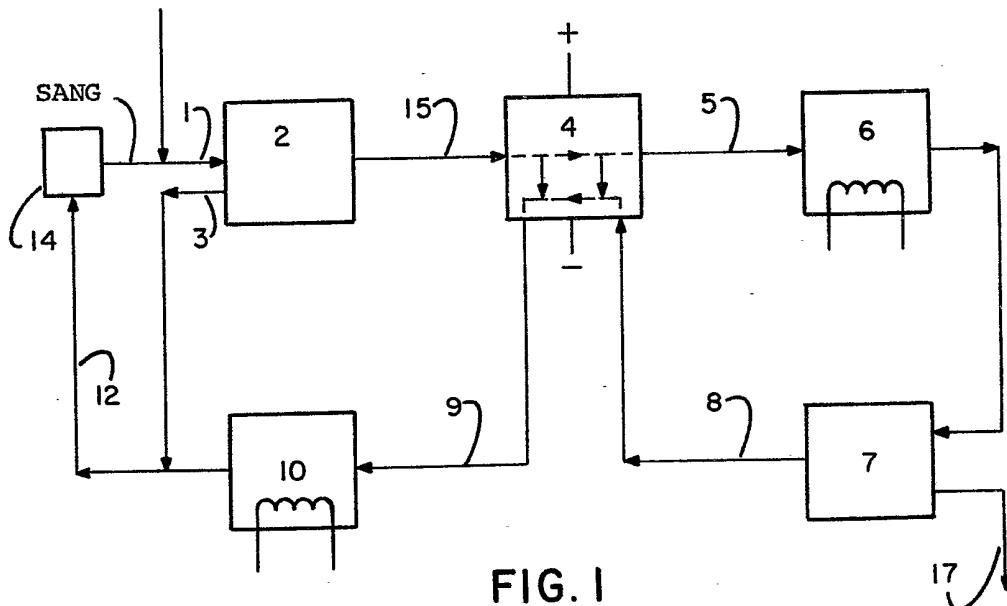


FIG. I

SOLUTION ANTICOAGULANTE

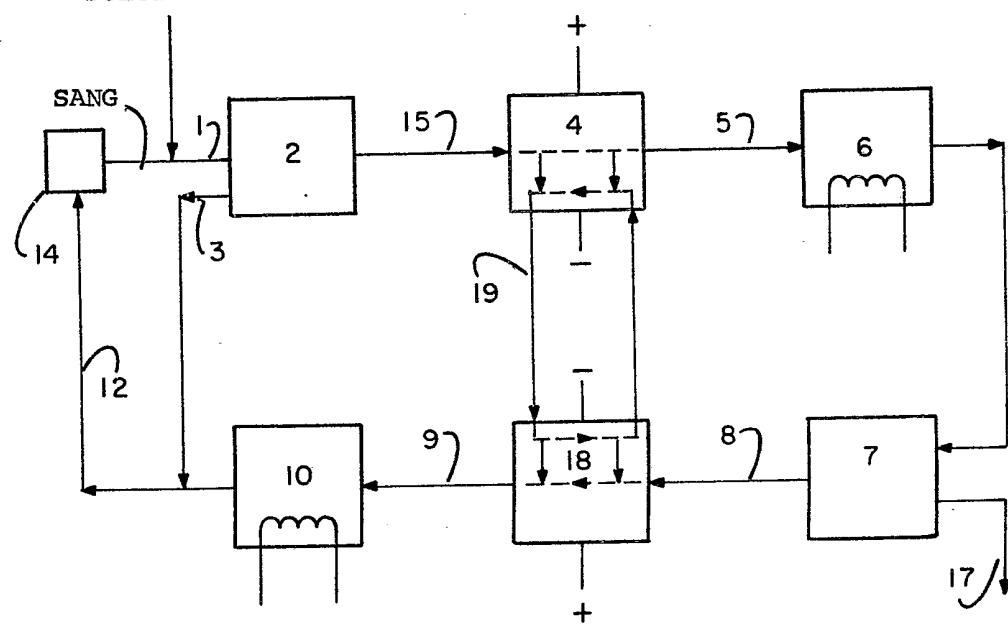


FIG. 2

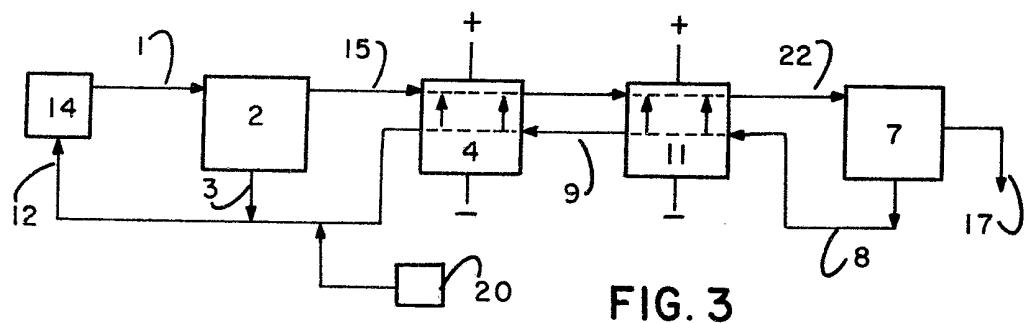


FIG. 3

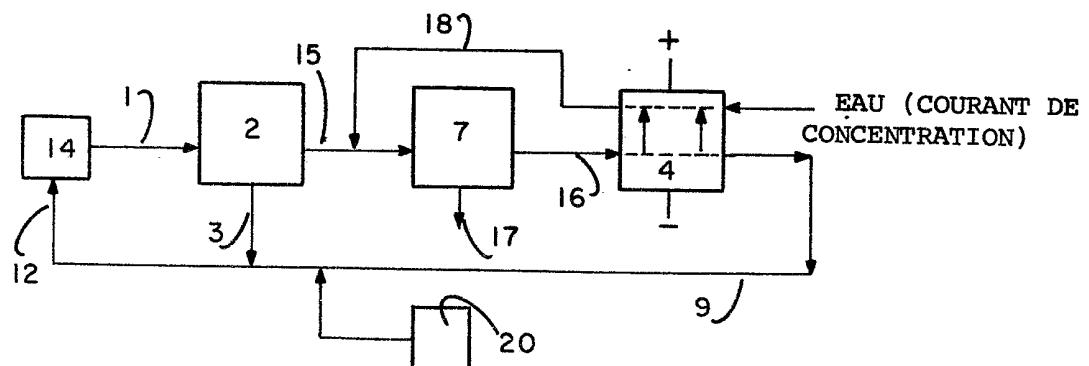


FIG. 4

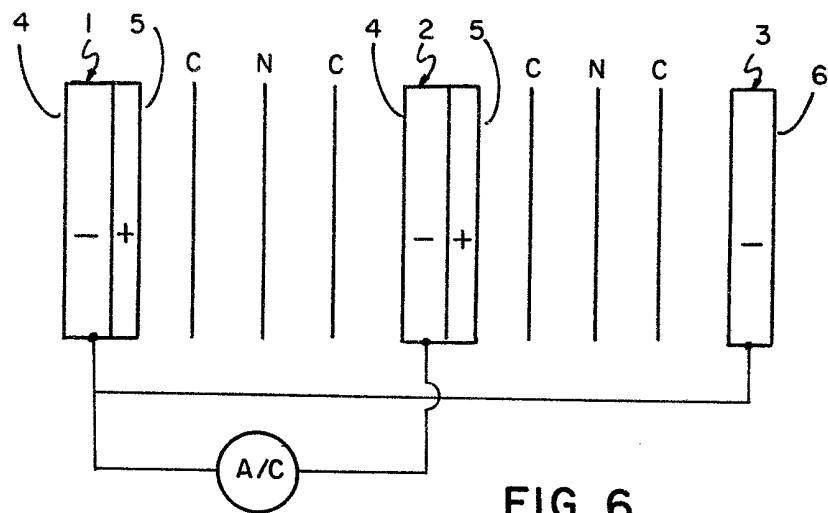


FIG. 6

ADJONCTION DIRECTE (Mélange de sel)
 ADJONCTION DIRECTE (6N Na_2SO_4)
 ADJONCTION PAR E.D. (Na_2SO_4)
 ADJONCTION PAR DIALYSE (Na_4SO_4)

FIG. 5

