

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 11.05.01.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 15.11.02 Bulletin 02/46.

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

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : LABORATOIRE FRANCAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
Groupement d'intérêt public — FR.

⑦2 Inventeur(s) : CHTOUROU ABDESSATAR SAMI,
PAOLANTONACCI PHILIPPE, SCHMITTHAUESLER
ROLAND et LIROCHON JACKY.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : CABINET LEPEUDRY.

⑤4 PROCEDE DE PREPARATION DE CONCENTRES D'IMMUNOGLOBULINES HUMAINES A USAGE
THERAPEUTIQUE.

⑤7 L'invention concerne un procédé de préparation de
concentrés d'immunoglobulines humaines à usage théra-
peutique, à partir de plasma ou d'une fraction de plasma. Le
procédé comprend une prépurification et une chromatogra-
phie unique sur échangeur d'anions effectuée à pH alcalin,
ce qui permet la rétention des immunoglobulines sur le sup-
port chromatographique et leur fractionnement.

Le procédé permet d'obtenir des concentrés d'immuno-
globulines G, A et M.

FR 2 824 568 - A1



L'invention concerne un procédé de préparation de concentrés d'immunoglobulines humaines à usage thérapeutique, à partir de plasma ou d'une fraction de plasma humain. Le procédé permet d'obtenir des concentrés
5 d'immunoglobulines G (IgG), d'immunoglobulines A (IgA) et d'immunoglobulines M (IgM).

L'utilisation de fractions de plasma humain enrichies en immunoglobulines pour le traitement de diverses infections ou déficiences congénitales est connue depuis la
10 mise au point du procédé de précipitation à l'éthanol par Cohn (Cohn et al. 1946, J. Am. Chem. Soc. 68, 459 ; Oncley et al. 1949, J. Am. Chem. Soc. 71, 541). Les indications thérapeutiques des immunoglobulines s'étant multipliées, il existe un besoin de produit toujours plus performant et plus
15 pur.

La complexité de la structure des immunoglobulines (quatre chaînes polypeptidiques réunies par des ponts disulfure), la variété des anticorps présents dans le mélange du plasma de plusieurs milliers de donneurs ne sont
20 pas actuellement des facteurs favorisant le développement biotechnologique des immunoglobulines. Bien que des anticorps monoclonaux soient produits par ingénierie génétique, leur extrême spécificité constitue un inconvénient pour les applications thérapeutiques où une
25 polyréactivité semble nécessaire.

De plus, de nombreuses pathologies, en particulier d'origine autoimmune, sont actuellement traitées par des concentrés d'IgG. Cette large utilisation a engendré une situation de pénurie en Europe et aux Etats-Unis, au cours
30 des dernières années.

Par ailleurs, dans ces mêmes pathologies, l'efficacité de préparations enrichies en IgM a été récemment démontrée (Hurez et al. Blood 90, 1997, 4004-4013), mais il n'existe pas de préparation à usage thérapeutique suffisamment
35 purifiée et concentrée en IgM.

C'est pourquoi la Demanderesse s'est attachée à la

mise au point d'un nouveau procédé de préparation d'immunoglobulines humaines. Le procédé peut s'appliquer à un "pool" de sérums (d'au moins 10000 donneurs) ce qui assure la présence de tous les anticorps normalement
5 présents dans l'ensemble de la population d'une contrée choisie, ou à des sérums hyperimmuns sélectionnés pour leur contenu en immunoglobulines spécifiques. Le procédé permet en outre de préparer des concentrés d'IgA et d'IgM.

De nombreuses variantes du procédé original de Cohn
10 ont été décrites. Elles proposent, outre la précipitation sélective des protéines à l'éthanol, divers traitements additionnels comme la précipitation au polyéthylène glycol, le traitement ménagé aux enzymes protéolytiques..., destinés à éliminer les agrégats de polymères d'immunoglobulines
15 (susceptibles d'activer le système du complément et de provoquer des réactions anaphylactiques).

Une voie alternative à la précipitation par l'éthanol a été décrite par Steinbuch et al. (Rev. Franç. Et. Clin. et Biol. 1969, XIV, 1054) qui fait appel à une précipitation
20 par l'acide octanoïque. Celui-ci précipite la plupart des protéines du plasma et laisse dans le surnageant les immunoglobulines. La purification de ces immunoglobulines est poursuivie par adsorption (en "batch") sur un échangeur d'anions, la DEAE-cellulose, qui laisse également les
25 immunoglobulines dans le surnageant. Celui-ci est ensuite concentré.

Divers procédés ont également été mis au point pour augmenter la pureté des produits par la mise en oeuvre de séparations chromatographiques. Les plus performants
30 (notamment EP 0 703 922, WO 99/64462) comprennent au moins deux étapes successives de chromatographie, l'une par échange d'anions, l'autre par échange de cations. La spécificité de ces procédés est apportée par la propriété des échangeurs d'anions de ne pas retenir les
35 immunoglobulines G, dans les conditions classiques de mise en oeuvre, mais de fixer la plupart des autres protéines co-

purifiées au cours des étapes de prépurification.

Diverses préparations d'IgG purifiées sont donc déjà disponibles mais leurs procédés de préparation posent encore des problèmes de rendement et de lourdeur de mise en oeuvre à l'échelle industrielle. Ces problèmes sont encore amplifiés par la nécessité d'inclure dans le procédé une inactivation virale impliquant une étape additionnelle d'élimination des agents virucides utilisés.

De plus, l'ensemble des procédés actuellement décrits ont été développés et optimisés pour la production des seules IgG.

La Demanderesse a trouvé qu'il était possible de produire plusieurs concentrés d'immunoglobulines en combinant une étape de prépurification et une étape unique de chromatographie par échange d'ions et ainsi de mettre en oeuvre un procédé très simple, à haut rendement et compatible avec un traitement virucide au solvant/détergent.

Ainsi le procédé selon la présente invention est applicable à du plasma sanguin ou à une fraction de plasma sanguin déjà enrichie en immunoglobulines et il comprend une prépurification par précipitation de contaminants lipidiques et protéiques et une chromatographie unique sur échangeur d'anions, effectuée à pH alcalin ce qui permet l'adsorption des immunoglobulines sur le support chromatographique échangeur d'anions.

La prépurification est effectuée au moyen d'agents précipitants connus tels que l'acide octanoïque, le phosphate tricalcique, la bentonite.

Après cette étape de prépurification et avant la chromatographie, le procédé comprend un traitement d'inactivation virale, de préférence par solvant-détergent, selon une méthode connue.

A la fin de ce traitement, le mélange du filtrat prépurifié et du solvant-détergent est soumis à une séparation chromatographique qui est effectuée sur un gel de polysaccharide réticulé ou de polymère vinylique, greffé de

groupements DEAE, TMAE ou QAE. Cette étape de chromatographie comprend

- l'ajustement à un pH de 8,9 à 9,1 de la solution ayant subi le traitement au solvant-détergent ;
- 5 - sa charge sur la colonne de chromatographie préalablement équilibrée en tampon à pH 8,9 à 9,1 ce qui permet l'adsorption des immunoglobulines et le passage des protéines non adsorbées dans l'effluent ;
- un lavage par le même tampon jusqu'à élimination de toutes
10 les protéines non adsorbées et du mélange solvant-détergent ;
- et l'élution des immunoglobulines par un tampon approprié.

Cette élution peut être réalisée soit par du tampon phosphate à pH compris entre 4 et 7, et de préférence à pH
15 6,2 pour éluer les immunoglobulines G, soit de manière séquentielle :

- dans un premier temps comme ci-dessus pour éluer les immunoglobulines G ;
- dans un deuxième temps, par le même tampon phosphate
20 additionné de NaCl 100 à 175 mM, et de préférence 150 mM, à un pH de 6,1 à 6,3, pour éluer une fraction contenant les IgA et des IgG4.

Le procédé peut être encore poursuivi par une nouvelle élution par
le même tampon ajusté à un pH de 6 à 7 et additionné de NaCl 250 à
25 350 mM, de préférence de 300 mM pour éluer les IgM.

Les immunoglobulines ainsi éluées sont récoltées, concentrées par ultrafiltration et soumises à une filtration stérilisante conventionnelle puis à une filtration au travers de filtres nanométriques de porosité décroissante de 100 à 15 nanomètres, en
30 particulier sur trois filtres disposés en série et de seuils de rétention décroissants, de 100, 50 et 20 nanomètres. Cette nanofiltration permet d'éliminer des virus résistants au traitement par solvant-détergent.

La solution d'immunoglobulines concentrée et filtrée est
35 additionnée d'un stabilisant pharmaceutiquement acceptable, puis elle est conditionnée à l'état de solution

stérile et éventuellement congelée et lyophilisée.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois en limiter la portée.

5 Exemple I

On utilise comme matériau de départ 1 Kg de précipité "I+II+III" obtenu à partir de plasma traité à l'éthanol selon la méthode de Cohn (déjà cité) ou de Kistler et Nitschmann (1962, Vox Sang. 7, 414).

10 Ce précipité est remis en suspension en tampon acétate (acétate de sodium-acide acétique) à pH 4,7-4,9, sous agitation, à 20°C.

On y ajoute de l'acide octanoïque jusqu'à une concentration finale de 20 g/l. L'addition doit être effectuée lentement, à température ambiante.

15 Le mélange est additionné d'un adjuvant de filtration et le précipité est séparé par filtration au moyen d'un filtre-presse.

Le filtrat est récupéré, clarifié et concentré par ultrafiltration, puis il est soumis à une filtration stérilisante à 0,45 µm et 0,2 µm.

Il est ensuite soumis à un traitement d'inactivation virale par solvant/détergent comme décrit par Neurath et Horowitz (brevet US 4,764,369).

25 On utilise un mélange Triton® X 100 (octoxinol 10)/TnBP.

Le mélange est ajusté à 64 g/l de protéines, à pH 6,5. Le contact est maintenu pendant 4 à 6 heures, entre 4 et 25°C. Ensuite le pH est ajusté à 9 (par NaOH).

30 Le mélange est ensuite soumis à une chromatographie d'échange d'anions sur colonne.

On utilise comme matériau échangeur d'anions du TMAE-Fractogel®, chargé dans une colonne de chromatographie, équilibré en tampon glycine-NaCl (glycine 0,676 g/l - NaCl 0,526 g/l) à pH 9.

35 Le mélange est chargé sur la colonne à raison de 50 g de protéines pour 1 litre de gel.

Après la charge, la colonne est lavée en tampon glycine - NaCl, pH 9 (le même que pour l'équilibrage). Le lavage est surveillé par la densité optique de l'effluent à 280 nm.

5 Après retour à la ligne de base, la colonne est éluée avec du tampon phosphate à pH 6,2 (hydrogénophosphate disodique - dihydrogénophosphate de sodium).

L'éluat, contenant les immunoglobulines G, est ajusté à pH 4,5 et soumis à une ultrafiltration sur cassettes.

10 La solution est ensuite soumise à une filtration stérilisante à 0,22 µm, puis à une filtration nanométrique sur trois filtres disposés en série et de seuils de rétention décroissants, de 100, 50 et 20 nanomètres. La filtration est suivie d'une ultrafiltration sur cassette
15 pour concentrer la solution finale à 120-150 g/l.

Les résultats d'analyse de trois lots pilotes sont présentés dans le tableau suivant.

20 Tableau I. : LOTS PILOTES

	00 ILP 043 PV	00 ILP 044 PV	00 ILP 045 PV
Polymères (%)	0.19	0.19	0.07
Dimères (%)	3.29	2.27	2.15
Monomères (%)	96.52	97.54	97.78
IgG (g/l)	52.5	50.4	50.8
IgG1 (g/l)	31.6	29.9	29.2
IgG2 (g/l)	17.1	15.3	13.1
IgG3 (g/l)	1.19	1.07	0.96
IgG4 (g/l)	0.52	0.61	0.56
IgM (µg/l)	310	459	1795
Anti-Hbs (UI/ml)	10.2	10.3	9.4

Exemple II

25 On utilise comme matériau de départ 1670 g de "précipité II" obtenu à partir de 80 litres de plasma traité

à l'éthanol selon la méthode de Cohn.

Cette variante du procédé permet notamment de tirer parti de précipités II congelés et stockés en attente de traitement.

5 Ce précipité est remis en suspension dans 9 kg d'eau-NaCl. Le pH est ajusté à 6,2 par de l'acide acétique.

On y ajoute, comme adsorbant (des contaminants de type lipidiques, kallikréine...), 15 g de phosphate tricalcique.

Après une heure de contact, le mélange est additionné
10 d'un adjuvant de filtration et le précipité est séparé par filtration au moyen d'un filtre-presse.

Le filtrat est récupéré, est additionné de glycine (15 g/l) et ajusté à pH 4,8 par de l'acide acétique.

On y ajoute, comme adsorbant (notamment des traces de
15 facteurs de coagulation activés) 80 g de bentonite, sous agitation pendant 30 minutes.

Le mélange est additionné d'un adjuvant de filtration et le précipité est séparé par filtration au moyen d'un filtre-presse.

20 Le filtrat est récupéré, concentré par ultrafiltration.

Le procédé est poursuivi (par traitement au solvant/détergent et chromatographie) comme dans l'exemple I.

25 Les résultats d'analyse de trois lots pilotes sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau II : LOTS PILOTES.

	286	287	321
Polymères (%)	0,5	0,5	< 0,1
Dimères (%)	2,8	2,8	1,4
Monomères (%)	96,7	96,7	98,5
IgG (g/l)	51,8	53,2	61,3
IgG1 (%)	62,5	62,6	64,4
IgG2 (%)	33,0	33,0	32,2
IgG3 (%)	3,2	3,3	2,2
IgG4 (%)	1,2	1,2	0,8
IgA (mg/l)	26,4	21,5	12,6
IgM (µg/l)	90,8	69,4	123
anti-Hbs			
(UI/ml)	147	122	8,6

Exemple III

5 Le procédé est mis en oeuvre de la même manière que dans l'exemple I mais le matériau de départ est du plasma (non précipité à l'éthanol).

10 Cette variante n'est pas avantageuse au point de vue du rendement mais elle présente un intérêt (par son nombre réduit d'étapes) pour le traitement de plasmas particulièrement riches en anticorps rares.

Exemple IV

15 Le procédé est mis en oeuvre de la même manière que dans l'exemple I mais la chromatographie est éluee de manière séquentielle :

après la charge et le lavage de la colonne, celle-ci est éluee avec un premier tampon phosphate à pH 6,2 pour éluer les IgG comme dans l'exemple I ;

20 ensuite elle est éluee avec le même tampon additionné de NaCl 150 mM, qui élue une fraction enrichie en IgA et en IgG4 ;

Les IgG4 semblent jouer un rôle dans la protection

contre les infections parasitaires et contre les allergies aux pollens et aux acariens.

De manière surprenante leurs propriétés biochimiques et leur comportement en échange d'ions les apparentent aux
5 IgA.

Exemple V

Le procédé est mis en oeuvre de la même manière que dans l'exemple IV mais après la deuxième élution qui produit
10 la fraction enrichie en IgA, le même tampon est additionné de NaCl 300 mM ce qui décroche les IgM. On obtient ainsi une fraction concentrée (à 80 %) d'IgM. Celles-ci sont concentrées et additionnées de stabilisants pharmaceutiquement acceptables.

15 Les résultats de production d'un lot d'IgM concentrées sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau III

(Lot IgM 2000-97)						
Fraction	Volume (ml)	Ig Totales (mg)	IgM (mg)	IgG (%)	IgA (%)	IgM (%)
Ig prépurifiées	2190	39957	2037	92.6	2,2	5.1
Fraction non retenue sur la colonne	3800	566,8	<32.3	86.5	<7.8	<5.7
Eluat 1 (IgG)	2700	37374	<22.9	99.8	<0.1	<0.1
Eluat 2 (IgA) (0.15M NaCl)	1350	3171	62.5	74.9	23.1	2
Eluat 3 (IgM) (0.3M NaCl)	114.5	1775.1	1545.7	6.2	6.8	87.1

REVENDEICATIONS

1.- Procédé de préparation de concentrés d'immunoglobulines humaines à usage thérapeutique à partir de plasma sanguin ou d'une fraction de plasma enrichie en immunoglobulines, caractérisé en ce qu'il comprend une prépurification par précipitation de contaminants lipidiques et protéiques et une chromatographie unique sur échangeur d'anions, effectuée à pH alcalin ce qui permet l'adsorption des immunoglobulines sur le support chromatographique échangeur d'anions.

2.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la prépurification est effectuée au moyen d'agents précipitants connus, tels que l'acide octanoïque, le phosphate tricalcique, la bentonite.

3.- Procédé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce qu'il comporte, après la prépurification et avant la chromatographie, un traitement d'inactivation virale, de préférence par solvant-détergent.

4.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la chromatographie est effectuée sur un gel de polysaccharide réticulé ou de polymère vinylique, greffé de groupements DEAE ou TMAE ou QAE.

5.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la chromatographie comprend

- l'utilisation de la solution ayant subi le traitement au solvant-détergent ;
- son ajustement à un pH de 8,9 à 9,1 ;
- sa charge sur la colonne de chromatographie préalablement équilibrée en tampon à pH 8,9 à 9,1 ce qui permet l'adsorption des immunoglobulines et le passage des protéines non adsorbées dans l'effluent ;
- un lavage par le même tampon jusqu'à élimination de toutes les protéines non adsorbées et du mélange solvant-détergent ;
- et l'élution des immunoglobulines par un tampon approprié.

6.- Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce

que l'élution est réalisée en une étape, par du tampon phosphate à pH compris entre 4 et 7, et de préférence à pH 6,2, pour éluer les immunoglobulines G.

5 7.- Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'élution est réalisée de manière séquentielle,

- dans un premier temps, par du tampon phosphate à pH compris entre 4 et 7, et de préférence à pH 6,2, pour éluer les immunoglobulines G ;

10 - dans un deuxième temps, par le même tampon phosphate additionné de NaCl 100 à 175 mM, et de préférence 150 mM, à un pH de 6 à 6,3, pour éluer une fraction contenant les IgA et des IgG4 .

15 8.- Procédé selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce qu'il comprend, en outre, une élution par le même tampon ajusté à un pH de 6 à 7 et additionné de NaCl 250 à 350 mM, de préférence 300 mM pour éluer les IgM.

20 9.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que, après l'élution des immunoglobulines, celles-ci sont récoltées, concentrées par ultrafiltration et soumises à une filtration stérilisante conventionnelle puis à une filtration au travers de filtres nanométriques de porosité décroissante de 100 à 15 nanomètres.

25 10.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la solution d'immunoglobulines concentrée et filtrée est additionnée d'un stabilisant pharmaceutiquement acceptable puis elle est conditionnée à l'état de solution stérile et éventuellement congelée et lyophilisée.

**RAPPORT DE RECHERCHE
 PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
 national

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

FA 606146
 FR 0106234

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	US 5 075 425 A (KOTITSCHKE RONALD ET AL) 24 décembre 1991 (1991-12-24) * revendications 1-7 *	1,2,4,5, 9,10	C12P21/00 C07K16/06
Y	---	3	
Y	US 6 069 236 A (BONNEEL PATRICK ET AL) 30 mai 2000 (2000-05-30) * revendications 1-9 *	3	
X	US 4 305 870 A (LIU DANIEL T H ET AL) 15 décembre 1981 (1981-12-15) * revendications 1-6 *	1,2,4,5, 9	
A	US 5 808 000 A (EIBL MARTHA ET AL) 15 septembre 1998 (1998-09-15) * revendications 1-30 *	7	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
			C07K
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		11 février 2002	Le Flao, K
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

1
 EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0106234 FA 606146**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 11-02-2002

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication		Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5075425	A	24-12-1991	DE	3927112 C1	25-10-1990
			AT	120963 T	15-04-1995
			DE	59008883 D1	18-05-1995
			EP	0413187 A1	20-02-1991
			ES	2070960 T3	16-06-1995
			JP	2044089 C	09-04-1996
			JP	3083932 A	09-04-1991
			JP	7068144 B	26-07-1995
US 6069236	A	30-05-2000	FR	2706466 A1	23-12-1994
			AT	193020 T	15-06-2000
			AU	7002394 A	03-01-1995
			BR	9406814 A	30-05-2000
			CA	2165203 A1	22-12-1994
			CZ	9503287 A3	17-07-1996
			DE	69424545 D1	21-06-2000
			DE	69424545 T2	18-01-2001
			DK	703922 T3	13-11-2000
			EP	0703922 A1	03-04-1996
			ES	2148332 T3	16-10-2000
			WO	9429334 A1	22-12-1994
			GR	3034177 T3	30-11-2000
			HU	74272 A2	28-11-1996
			JP	9500369 T	14-01-1997
PT	703922 T	30-11-2000			
US 4305870	A	15-12-1981	AUCUN		
US 5808000	A	15-09-1998	DE	4424935 C1	21-03-1996
			AT	406265 B	27-03-2000
			AT	118995 A	15-08-1999
			AT	206718 T	15-10-2001
			CA	2153858 A1	15-01-1996
			DE	59509679 D1	15-11-2001
			DK	692491 T3	03-12-2001
			EP	0692491 A1	17-01-1996
			JP	2955211 B2	04-10-1999
JP	8059699 A	05-03-1996			