

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

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

2 600 255

②1 N° d'enregistrement national :

87 08639

⑤1 Int Cl⁴ : A 61 K 37/00; C 07 K 15/06.

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 19 juin 1987.

③0 Priorité : US, 20 juin 1986, n° 876 689.

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 52 du 24 décembre 1987.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : *Société dite : NORTHFIELD LABORATO-
RIES, INC. — US.*

⑦2 Inventeur(s) : Lakshman R. Sehgal, Richard E. DeWos-
kin, Gerald S. Moss, Steven A. Gould, Arthur L. Rosen et
Hansa Sehgal.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Rinuy, Santarelli.

⑤4 Substituant acellulaire des hématies.

⑤7 Substituant acellulaire des hématies, qui comprend une
hémoglobine pyridoxylée polymérisée, réticulée, pratiquement
dépourvue de tétramère et de stroma, et un support non
toxique, pharmaceutiquement acceptable.

Sa préparation consiste à séparer le stroma érythrocytaire
du sang, à effectuer une pyridoxylation, une polymérisation,
puis à éliminer pratiquement la totalité du tétramère non
modifié restant.

Application : utilisation de ce substituant en une quantité
pharmaceutiquement efficace par administration par voie intra-
veineuse à un mammifère présentant un trauma, une anémie
aiguë ou divers troubles.

FR 2 600 255 - A1

D

La présente invention a pour objet un substituant acellulaire des hématies comprenant une solution d'hémoglobine pyridoxylée polymérisée réticulée pratiquement dépourvue de tétramère et qui est dépourvue d'impuretés provenant du stroma. Elle concerne en outre un procédé de préparation du substituant acellulaire des hématies.

Depuis plusieurs années, il est connu dans la pratique qu'une hémoglobine dépourvue de stroma possède des capacités de transport de l'oxygène et de liaison réversible à l'oxygène (ou de ligand). Puisque des problèmes de toxicité ont empêché son utilisation comme substituant du sang, l'hémoglobine dépourvue de stroma a nécessité d'autres modifications pour donner un produit non toxique, utile du point de vue pharmaceutique. Les brevets des Etats-Unis d'Amérique N° 4 001 200, N° 4 001 401 et N° 4 053 590 décrivent une hémoglobine polymérisée, réticulée, dépourvue de stroma, servant de substituant du sang pour le transport de l'oxygène aux tissus et aux organes et d'agent augmentant le volume du plasma sanguin. Il a été montré que la pyridoxylation de l'hémoglobine dépourvue de stroma modifie avantageusement les capacités de fixation réversible de l'oxygène et accroît la stabilité et la durée de conservation du produit biologique. J. Surgical Research 30:14-20 (1981). L'hémoglobine pyridoxylée polymérisée avec du glutaraldéhyde a été décrite et caractérisée dans L.R. Sehgal et collaborateurs, In Vitro and In Vivo Characteristics of Polymerized, Pyridoxylated Hemoglobin Solution, Fed. Proc. 39:2383 (1980) ; L.R. Sehgal et collaborateurs, Preparation and In Vitro Characteristics of Polymerized, Pyridoxylated Hemoglobin, Transfusion 23(2):158 (Mars-Avril 1983). De plus, l'aptitude de l'hémoglobine pyridoxylée polymérisée à jouer le rôle de support de l'oxygène a été décrite dans L.R. Sehgal

et collaborateurs, Polymerized, Pyridoxylated Hemoglobin : A Red Cell Substitute with Normal Oxygen Capacity, Surgery 95(4):433-38 (Avril 1984) ; L.R. Sehgal et collaborateurs, An Appraisal of Polymerized, Pyridoxylated Hemoglobin as an Acellular Oxygen Carrier, Advances in Blood Substitute Research 19-28 (Alan R. Liss, Inc. 1983).

Depuis de nombreuses années, les chercheurs ont indiqué que des solutions d'hémoglobine préparées par diverses techniques, tout en étant capables de véhiculer des quantités d'oxygène suffisantes pour permettre la vie, possèdent des effets secondaires indésirables. L'effet secondaire le plus gênant est une diminution des performances du rein. On a supposé que ces modifications étaient dues à la présence d'impuretés indésirables, comme une endotoxine bactérienne ou des fragments de membranes d'hématies (stroma). Bien que de telles impuretés puissent effectivement produire des altérations rénales, des solutions d'hémoglobine pratiquement dépourvues des impuretés ci-dessus entraînent toujours un dysfonctionnement rénal notable. Bien que ce dysfonctionnement soit temporaire et réversible, il peut être très alarmant dans une situation médicale comme un choc hémorragique, le rein étant déjà menacé dans cet état de faible débit sanguin. La cause du dysfonctionnement rénal a été attribuée à des quantités physiologiquement inacceptables de tétramère d'hémoglobine non polymérisé. D'autres effets secondaires indésirables de l'injection intraveineuse lente d'hémoglobine tétramère sont une toxicité rénale, une vasoconstriction, une hémoglobinurie, une diminution de la fréquence des pulsations cardiaques, une élévation de la pression sanguine artérielle moyenne et une extravasation de la substance injectée par voie intraveineuse lente, notamment dans la cavité péritonéale.

Dans la pratique, aucun substituant du sang connu, dérivé de l'hémoglobine, ne s'est révélé satisfaisant pour éviter totalement les problèmes de toxicité. Ces produits préparés dans l'état actuel de la technique se sont révélés contenir des quantités variables de tétramère d'hémoglobine. Par exemple, le procédé de préparation conforme aux brevets des Etats-Unis d'Amérique N° 4 001 200, N° 4 001 401 et N° 4 053 590 ne donne pas un produit thérapeutiquement utile. Tout d'abord, comme dans d'autres procédés, il existe une forte quantité indésirable de tétramère d'hémoglobine non polymérisé dans le produit final. Deuxièmement, de trop nombreuses impuretés, comme une quantité résiduelle de toluène toxique, peuvent rester dans la solution puisqu'elles ne peuvent être éliminées totalement au cours de la préparation. Troisièmement, le produit, décrit comme possédant une P_{50} comprise entre 13,3 et 16 kPa, est non fonctionnel du point de vue physiologique, la solution d'hémoglobine ne pouvant fixer l'oxygène dans les poumons. Enfin, des proportions accrues de polymères de poids moléculaires supérieurs donnent un produit ayant une forte labilité de gélification, de sorte que les étapes ultérieures de filtration et de purification sont difficiles ou impossibles à effectuer, sauf avec des solutions diluées de manière inacceptable.

Un objectif important de la présente invention consiste à proposer une solution d'hémoglobine non toxique thérapeutiquement utile comme substituant acellulaire des hématies.

Un autre objectif consiste à proposer une solution d'hémoglobine non toxique ayant des capacités réversibles de fixation de l'oxygène, qui ne nécessite pas des études de compatibilité avec un receveur.

Un autre objectif consiste à proposer une solution d'hémoglobine polymérique pure pratiquement

dépourvue de tétramère d'hémoglobine non modifié, ayant une capacité normale de transport de l'oxygène.

Un autre objectif encore consiste à proposer un support temporaire de l'oxygène qui puisse être débar-
5 rassé pratiquement en totalité des antigènes microbiens et viraux et des agents pathogènes.

En ayant à l'esprit ce qui précède ainsi que d'autres objectifs, la présente invention propose une hémoglobine pyridoxylée polymérisée, réticulée, prati-
10 quement dépourvue de tétramère, qui est pratiquement dépourvue de stroma et d'autres impuretés.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention ressortiront de la description détaillée qui va suivre, faite en regard des dessins annexés sur lesquels :
15

la figure 1 est un diagramme schématique du procédé discontinu de pyridoxylation ;

la figure 2 est un diagramme schématique de la pyridoxylation et de la polymérisation facilitées par une membrane, conformément à la présente invention ;
20

les figures 3A, 3B et 3C sont des graphiques montrant un examen par densitométrie d'une hémoglobine pyridoxylée, polymérisée, réticulée, pratiquement dépour-
25 vue de tétramère, séparée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide au dodécylsulfate de sodium ;

la figure 4 représente un type d'élution d'une hémoglobine pyridoxylée, polymérisée, réticulée, obtenu dans une colonne de filtration sur gel ;

la figure 5 représente un type d'élution d'une hémoglobine pyridoxylée, polymérisée, réticulée,
30 pratiquement dépourvue de tétramère, obtenu dans une colonne de filtration sur gel ;

la figure 6A est un graphique montrant la courbe spectrale de l'oxyhémoglobine ;

la figure 6B est un graphique montrant la courbe spectrale obtenue avec une hémoglobine pyridoxylée, polymérisée, réticulée, oxygénée, pratiquement dépourvue de tétramère ;

5 la figure 7 est un graphique décrivant la relation entre la concentration en hémoglobine de l'hémoglobine pyridoxylée, polymérisée, réticulée, pratiquement dépourvue de tétramère et la pression oncotique (POC);

10 la figure 8 est un graphique décrivant la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine pour une hémoglobine pyridoxylée, polymérisée, réticulée, pratiquement dépourvue de tétramère ;

15 la figure 9 est un graphique décrivant le type d'élution d'une hémoglobine pyridoxylée, polymérisée, réticulée, pratiquement dépourvue de tétramère, dans une colonne de chromatographie en phase liquide sous haute pression ;

20 la figure 10 est un graphique décrivant la relation entre la concentration en hémoglobine de l'hémoglobine pyridoxylée, polymérisée, réticulée, pratiquement dépourvue de tétramère, et la viscosité de la solution; et

25 la figure 11 est un graphique décrivant la courbe de disparition plasmatique d'une hémoglobine dépourvue de stroma (HDS) et d'une hémoglobine pyridoxylée, polymérisée, réticulée, pratiquement dépourvue de tétramère.

30 La présente invention concerne un substituant acellulaire des hématies comprenant une hémoglobine pyridoxylée polymérisée, réticulée, qui est pratiquement dépourvue de tétramère, de stroma et d'autres impuretés.

35 Aux fins de la présente invention, le terme "réticulé" signifie l'emplacement chimique de "ponts" moléculaires sur ou dans une molécule, ou entre des molécules, en vue de modifier la forme, les dimensions,

la fonction ou les caractéristiques physiques de la molécule. L'expression "pratiquement dépourvue de tétramère" désigne le degré de pureté en ce qui concerne le taux de contamination par le tétramère auquel certaines réponses biologiques au tétramère administré à un mammifère ne sont plus présentes. Un critère essentiel est l'absence d'altérations de la fonction rénale lorsque des quantités pharmaceutiquement efficaces sont administrées par injection intraveineuse lente, c'est-à-dire à un degré de pureté égal ou supérieur à environ 98 % (une quantité de tétramère inférieure à environ 2 % étant présente). L'expression "produit ultra-purifié" ou "produit purifié" possède la même signification, le produit étant pratiquement dépourvu de tétramère. L'expression "solution de polymérisation" définit une solution contenant un agent de "réticulation" ou de polymérisation, comme le glutaraldéhyde, des imidoesters, la Diaspirine ou d'autres agents, dans un véhicule convenable du point de vue biochimique. L'expression "membrane semipermeable" désigne une membrane perméable à certaines espèces moléculaires et non à d'autres et, en particulier, une membrane qui sert de filtre sélectif permettant l'exclusion des poids moléculaires égaux et supérieurs à environ 30 000 daltons.

Le produit du procédé conforme à la présente invention, une solution d'hémoglobine pyridoxylée polymérisée, pratiquement dépourvue d'hémoglobine tétramère (naturelle) et de diverses autres impuretés, est physiologiquement acceptable, ainsi qu'utile du point de vue thérapeutique et clinique. Le produit possède des capacités réversibles de fixation de l'oxygène qui sont nécessaires pour les propriétés de transport de l'oxygène. Plus précisément, le produit présente de bonnes caractéristiques de charge et de décharge lors de l'utilisation, en corrélation avec la possession d'une courbe

de dissociation oxygène-hémoglobine (P_{50}) similaire à celle du sang entier. Le produit présente une forte affinité de fixation de l'oxygène dans les capillaires passant à travers les poumons, puis libère de manière adéquate l'oxygène dans les tissus du corps. De plus, le produit ne nécessite pas d'études de compatibilité avec le receveur.

Le procédé de la présente invention est remarquable en ce qu'il donne un produit dépourvu d'impuretés du type tétramère, à un degré inconnu précédemment dans le fractionnement et la purification des hémoglobines polymériques. Le procédé de la présente invention offre un autre avantage en ce qu'il rend le produit final pratiquement dépourvu d'antigènes microbiens et viraux et d'agents pathogènes. Ces antigènes et agents pathogènes comprennent, par exemple, des substances provenant de bactéries, de rickettsies, de champignons, de protozoaires, de virus et d'autres organismes. De manière plus importante, on peut rendre le produit biologique pratiquement dépourvu de virus responsables de l'hépatite et du syndrome d'immuno-déficienciae acquise (SIDA). Un produit dépourvu d'hémoglobine tétramère et de diverses autres impuretés posséderait l'utilisation clinique, la facilité d'utilisation et la sécurité les plus grandes.

Dans la mesure où les propriétés physiologiques sont concernées, le produit biologique de la présente invention ne provoque pas de vasoconstriction, de toxicité rénale, d'hémoglobinurie et d'autres problèmes impliqués lors de l'administration intraveineuse des solutions d'hémoglobine connues contenant des quantités indésirables d'hémoglobine tétramère. Par administration intraveineuse du produit décrit dans le présent mémoire, les résultats n'ont montré aucune diminution appréciable de la production d'urine, aucune diminution appréciable de la vitesse de filtration glomérulaire,

aucune extravasation appréciable dans la cavité péritonéale et aucune modification appréciable de la couleur de l'urine produite.

En conséquence, le substituant acellulaire
5 des hématies de la présente invention présente un intérêt dans le traitement des trauma, de l'infarctus du myocarde, des attaques, de l'anémie aiguë et des troubles liés à une déficience en oxygène, comme l'hypoxémie, l'hypoxie ou l'hypoxie au stade final dus à une déficience ou
10 une incapacité du poumon à oxygéner totalement le sang. Le produit présente également une utilité dans le traitement de n'importe quel trouble ou état médical nécessitant un liquide de réanimation (par exemple un trauma, notamment un choc hémorragique), un agent augmentant
15 le volume intravasculaire ou une exsanguino-transfusion. Outre le traitement médical, le produit peut être utile pour la conservation des organes destinés aux greffes.

La présente invention concerne en outre des
procédés d'utilisation de ce produit biologique pour
20 le traitement médical par administration par voie intraveineuse à un mammifère nécessitant un tel traitement d'une quantité pharmaceutiquement efficace de l'hémoglobine pyridoxylée polymérisée, réticulée, pratiquement dépourvue de tétramère et de stroma, conjointement avec
25 un support non toxique, pharmaceutiquement acceptable. Une exsanguino-transfusion comporte le remplacement du sang du patient par le substituant acellulaire des hématies de la présente invention en utilisant des techniques classiques dans le traitement de certains états
30 ou troubles comme, par exemple, un empoisonnement du sang, des maladies auto-immunes, etc. La quantité pharmaceutiquement efficace varie suivant la thérapeutique désirée pour la maladie ou l'état médical particulier traité et des paramètres de posologie classiques, comme,
35 par exemple, le poids corporel du patient. En général,

la quantité pharmaceutiquement efficace est, bien sûr, l'intervalle de posologie que les médecins et les autres membres du personnel hospitalier jugent médicalement utiles dans la pratique. La manière de choisir une posologie dans n'importe quelle situation donnée est évidente pour le praticien. Le support pharmaceutiquement acceptable est de préférence non toxique, inerte et compatible avec l'hémoglobine. Des exemples de ces supports comprennent, mais à titre non limitatif, l'eau, une solution de sel équilibrée, une solution physiologique de sel (par exemple la solution de Ringer au lactate, la solution de Hartman, etc.), une solution de D-glucose, etc.

Là matière de départ préférée dans le procédé de la présente invention est le sang humain dont la date de péremption a été dépassée. De préférence, le sang n'est pas utilisé dans ce procédé s'il a été entreposé pendant une durée supérieure à huit semaines après expiration de la date imprimée sur la poche. Tous les procédés décrits dans le présent mémoire peuvent s'appliquer au sang d'autres mammifères, avec la possibilité de modifications faibles connues de l'homme de l'art.

Le procédé global peut être mis en oeuvre à une température d'environ 2°C à environ 8°C, de préférence à environ 5°C. Le sang dont la date de péremption a été dépassée est lavé avec environ deux à environ cinq volumes d'une solution isotonique de sel, comme le chlorure de sodium à 0,9 %. La solution de lavage peut contenir facultativement des antibiotiques, par exemple la pénicilline, la streptomycine, la gentamycine, le sulfate de polymyxine B, etc. L'addition d'antibiotiques n'est pas indispensable au procédé mais peut réduire au minimum la contamination bactérienne si le procédé est mis en oeuvre dans un environnement non pharmaceutique.

Les hématies sont lavées, tassées, rassemblées et lysées avec un tampon contenant un phosphate de métal alcalin (par exemple le phosphate de sodium) ou de l'eau apyrogène. L'étape suivante consiste à séparer le stroma érythrocytaire de la solution. L'élimination du stroma érythrocytaire peut être effectuée par filtration sur des micropores. Un procédé préféré est l'utilisation d'une filtration à courant transversal avec des cartouches à fibres creuses. Des exemples de systèmes de filtration à courant transversal sont le système Pellicon (Millipore Corp., Bedford, MA) ; le système d'ultrafiltration HF-Lab 15 (Romicon Corp., Woburn, MA) ; le KROFLOW KF200-100 (Microgon, Laguna Hills, CA) ou le système DC-30 (Amicon, Danvers, Mass). Des systèmes sont disponibles pour des échantillons plus petits ou plus gros que ceux qui sont décrits dans l'exemple ci-dessous.

Au cours de l'étape suivante, la solution d'hémoglobine dépourvue de stroma est pyridoxylée en utilisant du pyridoxal-5'-phosphate en un rapport molaire à l'hémoglobine d'environ 2:1 à 4:1. La pyridoxylation s'effectue avantageusement en présence d'un tampon acide, comme le tampon trichlorhydrate à une concentration finale d'approximativement 0,1 M et d'environ 1 g/l de glutathione. La solution est totalement désoxygénée en utilisant un échangeur de gaz avec de l'hélium, de l'azote ou un autre gaz inerte, avantageusement avec des réservoirs d'azote gazeux ou d'azote liquide. N'importe quel tube utilisé pour pomper la solution doit être de préférence imperméable ou perméable au minimum à l'oxygène, comme le tube Tygon B-44 (Cole-Palmer Co., Chicago, IL). Un agent réducteur comme le cyanoborohydrure de sodium ou de préférence le borohydrure de sodium est ajouté à la solution désoxygénée. Les réactifs en excès peuvent être éliminés par dialyse contre de l'eau apyrogène en utilisant un filtre de dialyse rénale,

comme le C-DAK 1,3 (Cordis Dow Corp., Miami, FL) ou le TH-15 (Terumo Corp., Tokyo, Japan). En variante, des cartouches d'ultrafiltration ayant une exclusion du poids moléculaire ne dépassant pas 30 000 daltons
5 peuvent être utilisées (des cartouches sont disponibles dans le commerce auprès de Amicon Corp., Romicon, Millipore).

Ensuite, la solution d'hémoglobine pyridoxylée dépourvue de stroma est polymérisée en utilisant
10 du glutaraldéhyde à 25 % (E.M. Grade, Polysciences, Warrington, PA). La solution d'hémoglobine pyridoxylée dépourvue de stroma est mise en contact avec le glutaraldéhyde à travers un filtre de dialyse rénale ou un autre filtre à membrane convenable. La durée de polymérisation
15 et la quantité de glutaraldéhyde ajoutée dépendent du volume de la solution d'hémoglobine, du rendement désiré en polymères et de la distribution des poids moléculaires désirée. En général, plus la durée de polymérisation est longue, plus la distribution des poids moléculaires
20 des polymères est élevée, plus leur rendement est élevé et plus la POC de la solution finale est basse. Normalement, un rendement en polymères d'approximativement 70 % est obtenu en une durée de 3,5 à 4 heures. Cela constitue le point final préféré de la polymérisation.
25 Un rendement de 80 à 90 % peut être obtenu en 7 heures, mais a pour résultat une distribution des poids moléculaires des polymères notablement supérieure (figure 3C).

Le procédé de polymérisation, lorsqu'il est
30 mis en oeuvre conformément à la présente invention, a pour résultat un rendement élevé en polymères. Pour obtenir un produit permettant une utilisation clinique fiable, il est très important d'ajuster la vitesse de réaction et la surface d'interaction au cours de la
35 polymérisation de manière à obtenir un produit ayant

un intervalle de distribution des poids moléculaires étroit , dont la moyenne est égale à environ 120 000 daltons. La réaction de polymérisation peut être contrôlée par la diminution de la pression oncotique en utilisant un oncomètre, comme le IL 186 (Instrumentation Laboratories, Danvers, MA) ou le Wescor Colloid Osmometer (Wescor, Logan, Utah), par chromatographie en phase liquide sous haute pression (CLHP) ou par n'importe quelle technique appropriée connue dans la pratique. Des traces de molécules de poids moléculaires élevés peuvent être présentes, comme permet de le déterminer l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide au dodécylsulfate de sodium (GEPA-DSS).

A l'interface de la membrane semipermeable au cours des étapes de pyridoxylation et de polymérisation du procédé de la présente invention, le support biochimique (c'est-à-dire l'eau, des sels, des sucres, d'autres petites molécules ou ions) possède une très grande liberté de mouvements de part et d'autre de la membrane en réponse aux forces hydrostatiques, hydrodynamiques, osmotiques ou oncotiques. Les molécules ou ions de l'agent actif (c'est-à-dire des agents de polymérisation, des agents réducteurs, des agents de pyridoxylation, etc.) possèdent une liberté de mouvements légèrement inférieure à travers la membrane, en raison de leurs dimensions et poids supérieurs. Les molécules d'hémoglobine ne peuvent pas du tout traverser la membrane intacte. Ce dispositif a pour résultat une exposition ajustée des molécules d'hémoglobine ou des autres matières de départ à l'agent actif. Les variables qui peuvent être modifiées sont le débit de la solution d'hémoglobine, la concentration d'hémoglobine en solution, la concentration de l'agent actif et le débit de l'agent actif. Outre les variables ci-dessus, on peut agir sur des variables comme la durée, la tempéra-

ture et la surface spécifique pour modifier ce dispositif pour une large gamme de corps réactionnels, réactions et rendements. La réaction totale peut s'effectuer dans un milieu physiologiquement acceptable. De plus, la
5 réaction de la solution d'hémoglobine peut être conduite sans que celle-ci présente une modification importante quelconque de dilution ou d'environnement ionique.

La figure 1 représente schématiquement le procédé discontinu de pyridoxylation. Une solution d'hémo-
10 globine dépourvue de stroma et de réactifs contenant du pyridoxal-5'-phosphate(6) est introduite dans le récipient ou réservoir 5 destiné au mélange. Le pH est ajusté et contrôlé au moyen d'une électrode de mesure du pH 7. Le réservoir 5 possède un évent ou soupape de sûreté
15 11. Un dispositif d'agitation, comme un mélangeur toroïdal comprenant un moteur électrique 9, des raccords par joints universels 9a pour le raccordement de l'arbre moteur à l'axe du mélangeur et un agitateur 10, permet un m é l a n g e continu. On fait passer par pompage
20 la solution 6 du réservoir 5 au moyen du dispositif de pompage 4 à travers un échangeur de gaz à membrane 1, puis on la renvoie dans le réservoir 5. Une source d' a z o t e 8 permet une circulation constante d'azote à travers l'échangeur de gaz à membrane 1 afin de désoxy-
25 g é n é r la solution 6. L'échangeur de gaz à membrane 1 contient un évent 3 destiné au dégagement des gaz. Une solution contenant un agent réducteur est ajoutée par l'orifice d'injection par seringue 2. La circulation de la solution d'hémoglobine désoxygénée se poursuit
30 à travers ce dispositif par une action de pompage constante fournie par le dispositif de pompage 4 jusqu'à obtention du rendement désiré en hémoglobine pyridoxylée.

La figure 2 représente un diagramme schématique de pyridoxylation et de polymérisation, respective-
35 ment, en utilisant la technique de membrane conformément

à la présente invention. Pour la pyridoxylation, une solution d'hémoglobine dépourvue de stroma et de réactifs contenant du pyridoxal-5'-phosphate 19 est introduite dans le récipient ou second réservoir 18 destiné au mélange. Le second réservoir 18 possède un évent ou soupape de sûreté 17. Un dispositif d'agitation, comme un mélangeur toroïdal comprenant un moteur électrique 16, des raccords par joints universels 16a et un agitateur 20, permet un mélange continu. Initialement, on fait passer par pompage continu la solution 19 à travers deux voies de désoxygénation, les orifices 31 et 32 étant fermés par une pince. Simultanément, on fait passer par pompage la solution 19 du second réservoir 18 au moyen du dispositif de pompage 15 à travers un échangeur de gaz à membrane 13 et au moyen du dispositif de pompage 21 à travers un échangeur de gaz à membrane 23 et un filtre à membrane pour dialyse rénale 27, puis on la renvoie dans le second réservoir 18. Les sources d'azote 12 et 24 permettent une circulation constante d'azote, respectivement, à travers les échangeurs de gaz à membranes 13 et 23 afin de désoxygéner la solution 19. Les échangeurs de gaz à membranes 13 et 23 possèdent les orifices 14 et 22 pour le dégagement des gaz. Le pH est contrôlé par l'électrode de mesure de pH 25 reliée à un pH-mètre par un conducteur électrique 26. Après désoxygénation, les orifices 31 et 32 sont ouverts. On fait passer par pompage au moyen du dispositif de pompage 28 une solution contenant un agent réducteur 30 du récipient ou premier réservoir 29 à travers le filtre à membrane pour dialyse rénale 27 et on la renvoie dans le premier réservoir 29.

Une fois la pyridoxylation terminée, la solution contenant l'agent réducteur 30 est remplacée par de l'eau apyrogène. On fait alors passer par pompage l'eau apyrogène au moyen du dispositif de pompage 28

à travers le filtre à membrane pour dialyse rénale 27 afin de dialyser les réactifs en excès et on la renvoie dans le premier réservoir 29. Les orifices 31 et 32 sont fermés par des pinces et on fait circuler en continu la solution 19 tout en la désoxygénant.

Pour la polymérisation, les orifices 31 et 32 sont ouverts. On fait circuler en continu à travers le dispositif la solution d'hémoglobine pyridoxylée dépourvue de stroma 19. L'eau apyrogène dans le premier réservoir 29 est remplacée par une solution de polymérisation contenant un agent polymérisant 30. On fait alors passer par pompage au moyen du dispositif de pompage 28 la solution de polymérisation à travers le filtre à membrane pour dialyse rénale 27 et on la renvoie dans le premier réservoir 29. Etant appauvri, l'agent de polymérisation est introduit progressivement dans le premier réservoir.

Dans son principe, on fait passer par pompage la solution contenant un agent réducteur destiné à la pyridoxylation ou la solution de polymérisation contenant un agent polymérisant d'un premier réservoir 29 à une face d'une membrane semipermeable dans le filtre à membrane pour dialyse rénale 27, tandis qu'on fait passer par pompage, respectivement, la solution d'hémoglobine désoxygénée ou la solution d'hémoglobine pyridoxylée désoxygénée d'un second réservoir 18 à la face opposée de la membrane. Une partie de la solution contenant un agent réducteur ou un agent de polymérisation diffuse à travers la membrane pour pyridoxyler ou polymériser l'hémoglobine sur l'autre face de la membrane. La portion de la solution contenant un agent réducteur ou un agent de polymérisation ne diffusant pas est renvoyée dans le premier réservoir 29. De manière similaire, la solution d'hémoglobine désoxygénée contenant l'hémoglobine pyridoxylée ou polymérisée est renvoyée dans le second

réservoir 18. Cette opération est effectuée en continu jusqu'à obtention du rendement désiré en produit.

5 A la fin de la polymérisation, la concentration en hémoglobine tétramère non polymérisée dans la solution peut être diminuée notablement par n'importe
quelles techniques de filtration et de purification
appropriées connues dans la pratique. L'élimination
de pratiquement la totalité du tétramère non modifié
10 restant peut être effectuée par pompage de la solution polymérisée à travers des cartouches d'ultrafiltration à fibres creuses, puis purification par chromatographie sur gel ou, en variante, seulement par chromatographie sur gel.

15 Les traces restantes d'hémoglobine tétramère non modifiée peuvent être complexées conformément à la présente invention par addition d'haptoglobine seule, traitement avec de l'haptoglobine après utilisation de cartouches d'ultrafiltration à fibres creuses et/ou chromatographie sur gel ou élimination par chromatographie d'affinité en utilisant de l'haptoglobine liée à un gel.
20 L'haptoglobine se lie irréversiblement à l'hémoglobine tétramère, même en présence d'hémoglobine polymérisée. L'haptoglobine se lie à l'hémoglobine dans un rapport molaire égal à 1:1. Une quantité d'haptoglobine comprise
25 entre 1,3 et 1,5 g est nécessaire pour la liaison à 1 g d'hémoglobine si la complexation est conduite en solution libre. En variante, l'haptoglobine peut être liée à un gel d'agarose activé.

30 Le pH de la solution finale est ajusté à approximativement 9 et équilibré avec des concentrations d'électrolytes représentant celles du plasma normal. Pour une utilisation clinique, les électrolytes qui peuvent être ajoutés comprennent, mais à titre non limitatif, le sodium, le potassium, des chlorures, le calcium,
35 le magnésium, etc. Des anti-oxydants classiques comme

Le glutathion, un ascorbate ou le glucose peuvent également être ajoutés facultativement. La solution finale peut être stérilisée en utilisant n'importe quelle technique bien connue appropriée pour l'application à des produits biologiques.

Les propriétés déterminantes de la solution de la présente invention en des quantités ou intervalles approximatifs sont indiquées avec celles du sang entier à titre de comparaison :

	<u>Hb polymérisée</u>	<u>Sang entier</u>
10 Hb	7 - 8 g/dl	12 - 15 g/dl
Capacité de transport de O ₂	9,7-25,0 % en volume	16,6-20,9 % en volume
15 Coefficient de liaison (à 37°C)	1,30 cm ³ /g Hb	1,32 cm ³ /g Hb
P ₅₀ (à une pCO ₂ égale à 5,33 kPa, pH 7,4, 37°C)	1,87-2,93 kPa	3,47 kPa
20 Méthémoglobine	inférieure à 15 %	inférieure à 2 %
Pression oncotique	0,93-4,0 kPa	2,67-3,33 kPa
Osmolarité	290-310 mOsM	290-310 mOsM
Teneur totale en phospholipides	inférieure à 0,004 mg/ml	
25 Viscosité (à 25°C)	3,2 cp (8 g/dl)	3,5 (Hct=45%)

Les exemples suivants démontrent certains aspects de la présente invention. Cependant, il doit être entendu que ces exemples sont proposés seulement à titre d'illustration et ne sont pas destinés à être absolument limitatifs quant aux conditions et au cadre de la présente invention. Toutes les températures sont exprimées en degrés Celsius, sauf spécification contraire. Il doit également être noté que, lorsque les conditions réactionnelles classiques (par exemple la température, les temps de réaction) ont été indiquées, les conditions qui sont supérieures et inférieures à ces intervalles mentionnés peuvent également être utilisées, bien que

généralement moins commodément.

On peut parvenir à une meilleure compréhension de la présente invention d'après les exemples non limitatifs suivants. Ces exemples ont été conduits oà
5 environ 5°C et sous la pression atmosphérique :

Exemple 1

Préparation d'une solution d'hémoglobine tétramère
dépourvue de stroma

Du sang humain dont la date de péremption
10 était dépassée a été lavé à deux reprises avec une solution de chlorure de sodium à 0,9 % contenant les antibiotiques suivants, par litre de solution :

	Pénicilline	50 000 U
	Streptomycine	50 mg
15	Gentamycine	40 mg
	Sulfate de polymixine B	2,5 mg

Les hématies (H) ont été lavées à deux reprises avec des volumes égaux de la solution ci-dessus et centrifugées à 2500 g pendant 15 minutes. Plus de
20 95 % de la phase de caillot blanc ont été éliminés avec un extracteur de plasma (Fenwal Laboratories, Morton Grove, IL). Les H lavées et tassées ont été alors rassemblées et lysées avec 3 à 4 volumes d'eau apyrogène. Cent unités de H lavées aboutissaient à un volume
25 de 15 à 20 litres à un hématocrite de 20 à 24 %.

Quinze à vingt litres de H lavées ont été versés dans 40 à 80 litres d'eau apyrogène froide. Le lysat ainsi préparé a été alors pompé à travers 2 à
30 4 cartouches à fibres creuses de 0,1 µm. Une pompe pneumatique (LP30, Amicon Corp., Danvers, MA) a été utilisée. Les cartouches correspondant à une exclusion de 0,1 µm étaient disponibles dans le commerce auprès de Romicon Inc., filiale de Rohm and Haas Co., Woburn, MA 01801. L'hémoglobine, pratiquement dépourvue de stroma
35 des H, avec le reste du contenu enzymatique des H, est passée à travers le filtre sous forme d'ultrafiltrat.

Des portions aliquotes du filtrat ont été centrifugées à plusieurs reprises au cours de la mise en oeuvre de ce procédé. L'absence d'un agglomérat a traduit la bonne intégrité de la membrane. Une séparation de 97 % d'hémoglobine pratiquement dépourvue de stroma a été obtenue.

Au cours de cette première étape de séparation, le volume du lysat a été réduit à 12 - 15 litres, et maintenu à cette valeur par addition d'eau apyrogène jusqu'à atteindre la séparation d'hémoglobine nécessaire. Simultanément avec cette étape, l'ultrafiltrat contenant l'hémoglobine a été concentré, à l'aide de 3 ou 4 filtres à cartouches à fibres creuses ayant une exclusion de 30k (H10 P30, Amicon Corp., Danvers, MA) et d'une pompe pneumatique LP 30. L'ultrafiltrat a été concentré à une concentration finale en hémoglobine comprise entre environ 20 et 22 g/dl.

Exemple 2

Autre procédé de préparation d'une solution d'hémoglobine tétramère dépourvue de stroma

Une solution de chlorure de sodium à 0,9 % a été ajoutée à des échantillons distincts de sang dont la date de péremption était dépassée. On a laissé les hématies et le caillot blanc se déposer pendant une nuit. Le surnageant et le caillot blanc ont été extraits.

Les cellules tassées ont été alors versées dans 3 à 5 volumes de solution de chlorure de sodium à 0,9 %. Les cellules ont été lavées et concentrées en utilisant un filtre à courant transversal à fibres creuses de 0,2 μ m (K205 - KROSFLOW, Microgon Corp., Laguna Beach, CA) et une pompe pneumatique (LP30, Amicon Corp., Danvers, MA). Les cellules tassées ont été alors lysées par addition de 3 à 5 volumes d'eau apyrogène. La filtration à courant transversal a été alors rétablie, l'hémoglobine tétramère étant recueillie avec le contenu

enzymatique des hématies dans l'ultrafiltrat, tandis que le stroma a été retenu par le filtre.

Des portions aliquotes du filtrat ont été centrifugées à plusieurs reprises au cours de la mise en oeuvre de ce procédé. L'absence d'un agglomérat traduisait la bonne intégrité de la membrane. Une séparation d'hémoglobine pratiquement dépourvue de stroma égale à 97 % a été obtenue. Simultanément avec cette étape, l'ultrafiltrat contenant l'hémoglobine a été concentré, à l'aide de 3 ou 4 filtres à cartouches à fibres creuses ayant une exclusion de 30k (H10 P30, Amicon Corp., Danvers, MA) et d'une pompe pneumatique LP 30. L'ultrafiltrat a été concentré à une concentration finale en hémoglobine comprise entre environ 20 et 22 g/dl.

15

Exemple 3

Pyridoxylation de l'hémoglobine dépourvue de stroma -

Configuration discontinue mixte

Une solution d'hémoglobine dépourvue de stroma a été préparée suivant le procédé de l'exemple 1 ou 2. Les réactifs suivants ont été mélangés ensemble:

1. Pyridoxal-5'-phosphate - en un rapport molaire à l'hémoglobine égal à 4:1 ;
2. tampon tris-HCl - concentration finale 0,1 M dans la solution d'hémoglobine ;
3. glutathion - 1 g/l de solution ;
4. acide ascorbique - 0,2 g/l ;
5. glucose 0,5 g/l ; et
6. antibiotiques - les mêmes antibiotiques que ceux décrits dans l'exemple 1.

30

Les réactifs ci-dessus ont été dissous dans un volume minimal d'eau apyrogène et le pH ajusté entre 7,25 et 7,45. Le mélange ci-dessus a été ajouté à la solution d'hémoglobine. Le pH de la solution d'hémoglobine a été ajusté entre 7,35 et 7,45 à 5°C avec NaOH 0,1 N. Finalement, la concentration en hémoglobine a

35

été ajustée entre 17,5 et 18,5 g/dl.

La solution (18-20 litres) a été alors transférée dans un réservoir en acier inoxydable étanche aux gaz. La désoxygénation de la solution a été effectuée en utilisant un échangeur de gaz à membrane (William Harvey, Bently Laboratories, Shiley Sales Corp., Irvine, CA). On a fait barboter de l'azote gazeux à travers l'échangeur à un débit d'environ 170 l/min. La solution d'hémoglobine a été pompée à travers l'échangeur de gaz à un débit de 4 à 6 l/min. L'élimination adéquate de l'oxygène a été définie comme une saturation en O_2 inférieure à 5 % et une teneur en oxygène inférieure à 1 % en volume (au moyen du Co-oxymètre IL 282, Instrumentation Laboratories, Lexington, MA). Cela a été effectué en 4 à 8 heures (voir figure 1).

On a ajouté à la solution d'hémoglobine dés-oxygénée du borohydrure de sodium 0,02 M (concentration finale) par litre de solution. Le borohydrure de sodium a été dissous dans une quantité non inférieure à 300-500 ml de NaOH 0,001 N. Il a été introduit par pompage dans la solution d'hémoglobine, à travers un orifice d'injection par seringue de l'échangeur de gaz, à une vitesse d'environ 100 ml/h. Une soupape de sûreté dans le réservoir en acier inoxydable a été maintenue ouverte pour éviter une augmentation de pression. Après addition de $NaBH_4$, la solution a été maintenue désoxygénée. Un rendement maximal d'environ 70 à 80 % en hémoglobine pyridoxylée a été obtenu en 6 à 10 heures. Le rendement a été déterminé en mesurant le décalage de la courbe de dissociation oxygène-hémoglobine (P_{50}).

Les réactifs en excès ont été éliminés par dialyse contre de l'eau apyrogène en utilisant un filtre pour dialyse rénale (C-DAK 1,3, Cordis Dow Corp., Miami, FL ou TH-15, Terumo, Tokyo, Japon). La solution a été maintenue désoxygénée au cours de la dialyse en mainte-

nant dans le circuit un oxygénateur à membrane. Le débit de N_2 à travers l'oxygénateur était égal à environ 100 l/min.

Exemple 4

5 Pyridoxylation de l'hémoglobine dépourvue de stroma - Configuration facilitée par une membrane

10 Une solution d'hémoglobine dépourvue de stroma a été préparée conformément au procédé de l'exemple 1 ou 2. Les réactifs suivants ont été mélangés ensemble :

1. pyridoxal-5'-phosphate - en un rapport molaire à l'hémoglobine égal à 2:1 ;
2. tampon tris-HCl - concentration finale 0,1M dans la solution d'hémoglobine ;
- 15 3. Glutathion - 1 g/l de solution ;
4. acide ascorbique - 0,2 g/l ;
5. glucose 0,5 g/l ; et
6. antibiotiques - les mêmes antibiotiques que ceux décrits dans l'exemple 1.

20 Les réactifs ci-dessus ont été dissous dans un volume minimal d'eau apyrogène et le pH ajusté entre 7,35 et 7,45. Le mélange ci-dessus a été ajouté à la solution d'hémoglobine. Le pH de la solution d'hémoglobine a été ajusté entre 7,35 et 7,45 à 5°C avec NaOH
25 0,1 N. La concentration en hémoglobine a été ajustée entre 17,5 et 18,5 g/dl.

La solution (18-20 litres) a été alors transférée dans un réservoir en acier inoxydable étanche aux gaz. La désoxygénation de la solution a été effectuée en utilisant un ou plusieurs échangeurs de gaz
30 à membranes (William Harvey, Bently Laboratories, Shiley Sales Corp., Irvine, CA). On a fait barboter de l'azote gazeux à travers l'échangeur à un débit d'environ 170 l/min. La solution d'hémoglobine a été pompée à
35 travers l'échangeur de gaz à un débit de 4 à 6 l/min.

L'élimination adéquate de l'oxygène a été définie comme une saturation en O_2 inférieure à 5 % et une teneur en oxygène inférieure à 1 % en volume (au moyen du coximètre IL 282, Instrumentation Laboratories, Lexington, MA). Cela a été effectué en 4 à 8 heures.

Dans ce procédé, l'oxygénateur à membrane ou échangeur de gaz 23 était monté en série avec un filtre pour dialyse rénale 27 (Terumo, TH-15) (voir figure 2). Les parties externes du filtre de dialyse ont été fermées par des pinces pour éviter une perte d'eau au cours de la désoxygénation.

Lorsque le point final de la désoxygénation a été atteint, 3 litres d'une solution de borohydrure de sodium à 5 g % ont été pompés à l'extérieur du filtre de dialyse. De cette manière, la pyridoxylation a été rapidement effectuée. Un rendement de 75 à 80 % en hémoglobine pyridoxylée a été obtenu en une demi-heure, et un rendement maximal de 85 à 90 % a été obtenu en 2 à 3 heures. Le rendement a été déterminé par la mesure du décalage de la courbe de dissociation oxygène-hémoglobine (P_{50}).

Les réactifs en excès ont été éliminés par dialyse contre de l'eau apyrogène en utilisant le filtre pour dialyse rénale en série (C-DAK 1,3, Cordis Dow Corp., Miami, FL ou TH-15, Terumo, Tokyo, Japon). La solution a été maintenue désoxygénée au cours de la dialyse. La vitesse de N_2 à travers l'oxygénateur était égale à environ 100 l/min.

Exemple 5

Polymérisation d'une hémoglobine pyridoxylée dépourvue de stroma

Une solution d'hémoglobine pyridoxylée dépourvue de stroma a été préparée suivant le procédé de l'exemple 3 ou 4. On a ajouté à la solution dialysée :

1. tampon au phosphate de sodium 0,1 M (concentration finale ;

2. antibiotiques tels qu'énumérés ci-dessus dans l'exemple 1 ; et

5 3. glutathion - 1 g/l.

Les substances chimiques ci-dessus ont été dissoutes dans 500 ml d'eau apyrogène et ajoutées à la solution d'hémoglobine. Le pH de la solution, à 5°C et en utilisant NaOH 0,5 N, a été ajusté à 8,0. La concentration en hémoglobine a été ajustée entre 14 et 15 g/dl par addition de tampon au phosphate 0,1 M. La solution a été maintenue désoxygénée en laissant l'oxygénateur à membrane en série. Un débit de N₂ d'environ 170 l/min a été maintenu.

15 On a fait passer par pompage la solution d'hémoglobine du récipient ou second réservoir 18 destiné au mélange à travers l'oxygénateur à membrane ou échangeur de gaz 23 dans un filtre pour dialyse rénale 27 (figure 2) à un débit compris approximativement entre 5 et 7 l/min. Un prélèvement d'échantillon a été effectué par l'orifice d'injection par seringue situé sur l'oxygénateur. La polymérisation n'a pas été déclenchée si le pourcentage d'oxyhémoglobine était supérieur à 10 %, tel que déterminé par co-oxymétrie. La solution 25 a été polymérisée à travers la membrane de dialyse rénale. La solution de polymérisation a été portée à un volume de 10 litres et contenait :

1. tampon au phosphate de sodium 0,1 M (même concentration finale que dans la solution d'hémoglobine);

30 2. antibiotiques - même concentration que dans la solution d'hémoglobine ;

3. glutathion - 1 g/l ; et

4. 175 - 225 ml de solution de glutaraldéhyde à 25 % (environ 14,8 à 18,1 moles de glutaraldéhyde par mole d'hémoglobine).

35

L'osmolarité de la solution de polymérisation était approximativement identique à celle de la solution d'hémoglobine.

L'écoulement de la solution d'hémoglobine désoxygénée a été tout d'abord établi à travers le filtre de dialyse tout en faisant circuler de l'eau apyrogène à l'extérieur. Une fois le débit requis établi, on a fait alors circuler la solution de polymérisation à l'extérieur. La solution a été pompée (pompes Cole-Palmer, têtes de pompes 7018) à un débit compris approximativement entre 0,4 et 0,6 l/min. La solution d'hémoglobine dans le réservoir a été soigneusement mélangée tout au long de la mise en oeuvre du procédé.

L'agent de polymérisation (glutaraldéhyde à 25 %) a été ensuite ajouté à la solution de polymérisation conformément au programme opératoire suivant :

	Heure 1	- 75 ml
	Heure 2	- 50 ml
	Heure 3	- 50 ml
20	Heure 4	- 50 ml
	Heure 5	- 50 ml
	Heure 6	- 25 ml
	Heure 7	- 10 ml

La polymérisation a été contrôlée par la chute de pression oncotique (POC). La réaction a été arrêtée lorsque la POC a atteint environ 5,33 kPa. Cela a été effectué en entraînant la solution de polymérisation hors du filtre de dialyse et en y introduisant par pompage de l'eau apyrogène. La dialyse contre de l'eau apyrogène a été effectuée pendant approximativement 2 heures. Un rendement en polymères d'approximativement 80 à 90% a été obtenu.

Exemple 6Ultrapurification d'hémoglobine pyridoxylée
polymérisée dépourvue de stroma

5 Une solution d'hémoglobine pyridoxylée polymérisée, dépourvue de stroma, a été préparée suivant le mode opératoire de l'exemple 5. L'élimination du tétramère non modifié a été effectuée en trois étapes :

ETAPE 1 :Ultrafiltration

10 On a fait passer par pompage la solution polymérisée à travers 3 ou 4 cartouches d'ultrafiltration à fibres creuses ayant une exclusion du poids moléculaire de 100 000 daltons (Amicon). Cette étape a été arrêtée lorsque la concentration en hémoglobine dans l'ultrafiltrat était bien inférieure à 0,1 % et est restée à cette valeur pendant au moins 2 heures. La solution d'hémoglobine polymérisée à cette étape était pure à
15 approximativement 90 %.

ETAPE 2 :Filtration sur gel

20 La deuxième étape de purification ayant pour résultat une solution polymérique pure à approximativement 95 - 98 % a été effectuée par chromatographie sur gel de la manière suivante :

25 Deux colonnes chromatographiques bioprocess de 60 cm x 25 cm (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) ont été remplies avec approximativement 55 litres d'Ultrogel ACA-54 (LKB Instruments, Gaithersburg, MD). Ce gel possédait une limite d'exclusion du poids moléculaire de 90 000 daltons. Les colonnes ont été reliées
30 en série avec entre elles un espace mort minimal, ayant pour résultat une longueur de gel réelle approximativement égale à 105 cm.

35 Un demi à un litre de la solution d'hémoglobine polymérisée provenant de l'étape 1, ayant une concentration en hémoglobine de 6 à 10 g/dl, a été chargé

sur la colonne à un débit d'approximativement 3 l/h. Après l'introduction, le tampon (phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,40 à 5°C) a été utilisé pour éluer l'hémoglobine à un débit de 3,0 l/h (figure 4). Le premier volume de 2,0 litres de la solution d'hémoglobine polymérisée qui a été éluée de la colonne a été conservé. La solution restante a été rejetée. La fraction de 2 litres provenant de la colonne a été concentrée en utilisant le système d'ultrafiltration Amicon CH-2 avec 1 à 3 cartouches H1P100 (figure 5). La solution ultra-purifiée a été concentrée. L'étape 2 a été répétée, telle que nécessaire pour diminuer la contamination de la solution polymérisée par le tétramère.

ETAPE 3 :

15 Chromatographie d'affinité

De l'haptoglobine (Hp) a été liée à un gel d'agarose activé, de la manière suivante :

De l'haptoglobine (à une pureté supérieure à 80 %) a été ajoutée à du Sepharose 4B activé par CnBr (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ), en un rapport de 3 mg de Hp/ml de gel sédimenté. Quatre volumes d'un tampon de couplage (bicarbonate de sodium 0,1 M, NaCl 0,3 M, pH 7,9) ont été ajoutés par volume de Sepharose. Le mélange a été agité doucement pendant une nuit à 4°C. Le rendement de cette réaction correspondait à 2mg de Hp/ml de gel sédimenté. Un excès du gel présentant une affinité pour Hp (par rapport à l'hémoglobine tétramère libre) a été ajouté à la solution d'hémoglobine pyridoxylée polymérisée et agité doucement à 4°C pendant 1 à 4 heures. La solution a été alors centrifugée doucement (4000 g pendant 2 minutes) et le surnageant recueilli. Des lavages et des centrifugations supplémentaires ont été effectués pour obtenir une séparation maximale de l'hémoglobine polymérisée. L'hémoglobine pyridoxylée polymérisée ainsi obtenue était dépourvue

à plus de 99,5 % d'hémoglobine tétramère non modifiée.

AUTRE VARIANTE DE REALISATION DE L'ETAPE 3

Complexation avec l'haptoglobine

Les traces finales d'hémoglobine tétramère non modifiée ont été éliminées de la solution d'hémoglobine pyridoxylée polymérisée en la complexant avec de l'haptoglobine (Hp). De l'haptoglobine a été ajoutée en un rapport molaire égal à 1:1 à l'hémoglobine tétramère libre. La solution a été mélangée à température ambiante pendant approximativement 2 heures.

Exemple 7

Composition pharmaceutique d'hémoglobine pyridoxylée polymérisée ultrapurifiée, dépourvue de stroma

Une solution d'hémoglobine pyridoxylée polymérisée ultrapurifiée, dépourvue de stroma, a été préparée suivant le mode opératoire de l'exemple 6. Le pH de la solution à 5°C, en utilisant NaOH 0,5 N, a été ajusté à environ 9,02 et équilibré avec un concentré d'électrolytes afin de parvenir aux concentrations suivantes dans la solution finale :

Na	140 meq/l
K	4,0 meq/l
Cl	100 meq/l
Ca ⁺⁺	5,0 meq/l
Mg	1,5 meq/l
Glutathion	1 g/l

Un cocktail enzymatique a été ajouté à la solution pour la stabiliser vis-à-vis de l'oxydation. Il contenait approximativement des quantités non inférieures aux quantités indiquées, par litre de la solution finale :

1. Glucose-6-phosphate-0,3 g
- 2 - Glucose-6-phosphate-déshydrogénase-0,20 mg
3. Ferrodoxine-6 mg

4. Ferredoxine -NADP-réductase-3 mg

5. NADP - 40 mg

6. Catalase - 0,2 g

5 La concentration finale en hémoglobine a été ajustée entre 7 et 18 g/dl.

Exemple 8

Technique de stérilisation

10 L'hémoglobine pyridoxylée polymérisée purifiée préparée suivant le mode opératoire de l'exemple 6 a été stérilisée en utilisant le schéma de filtration suivant, avec les filtres Pall Profile (Pall Corp., Glen Cove, NY) :

010 ---> 007 --> 005 --> NR7P.(0,2 µm absolu)

15 1 µm 0,7 µm 0,5 µm 0,2 µm

La matière du filtre était du polypropylène. Le filtre stérilisant final de 0,22 µm était en "Nylon". Les filtres étaient de qualité pharmaceutique.

20 La solution ainsi stérilisée n'a montré aucune croissance sur des plaques de gélose au sang (37°C/4 jours ou 25°C/10 jours) ou dans du bouillon au thio-glycolate. La solution contenait des traces (0,25 ng/ml) d'endotoxine, sur la base de l'essai de lysat d'amibocyte de Limulus, lorsqu'elle était préparée dans un environne-
25 ment non pharmaceutique.

Exemple 9

Caractéristiques biochimiques

30 L'hémoglobine pyridoxylée polymérisée dépourvue de tétramère présentait un spectre d'absorption normal obtenu au moyen d'un spectrophotomètre enregistreur Beckman DU (Beckman Instruments, Lincolnwood, IL) (figure 6B). La solution, une fois reconstituée à une concentration d'hémoglobine normale (12-14 g/dl), a donné une solution ayant une pression oncotique (POC)
35 acceptable (1,93 à 3,00 kPa) (figure 7). En ce qui con-

cerne la figure 7, la concentration en hémoglobine a été déterminée sur le co-oxymètre IL 282 (Instrumentation Laboratories, Danvers, MA). La POC a été mesurée sur le Wescor Colloid Osmometer Modèle 4400 (Boyce Scientific Inc., Hanover Park, IL). A titre de comparaison, la courbe obtenue avec l'hémoglobine dépourvue de stroma non modifiée (HDS) est également représentée. Le procédé de polymérisation n'altère pas la capacité de fixation de l'oxygène de l'hémoglobine (1,30 cm³/g). Le produit, une fois reconstitué à une concentration d'hémoglobine normale, possédait une capacité de transport de l'oxygène normale.

La P₅₀ du produit était comprise entre 1,87 kPa et 2,93 kPa, lorsqu'elle était déterminée dans des conditions physiologiques de pH, de pCO₂ et de température. Une courbe de dissociation d'oxyhémoglobine classique pour le produit est indiquée sur la figure 8. L'opération a été effectuée sur l'échantillon dans des conditions standard de pH égal à 7,40, de température égale à 37°C et de pCO₂ égal à 5,33 kPa. La courbe continue a été produite par l'analyseur de dissociation d'oxygène Hem-O-Scan (Travenol Laboratories, Deerfield, Illinois).

Il a été révélé que la distribution de poids moléculaire du produit, sur la base d'une CLHP, était comprise entre 120 000 et 600 000 daltons (figure 9). Le poids moléculaire moyen estimé d'après les résultats était égal à environ 120 000. La figure 9 décrit le type d'élution à partir d'une colonne de CLHP (gel TSK, type G 4000 S.W., Varian Instruments Group, Palo Alto, CA). Le tampon d'élution utilisé était du phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,0 (à 25°C) avec du chlorure de sodium 0,1 M (osmolarité = 353 mOsm). La concentration en hémoglobine de l'échantillon a été ajustée à approximativement 3,0 g/dl. Le volume d'échantillon injecté

était égal à 0,1 ml. Le débit était égal à 1 ml/min. (La pompe de CLHP (modèle 2150), le détecteur UV (modèle 2238 Uvicord SII) et l'intégrateur-enregistreur (modèle 2220) étaient fabriqués par LKB Instruments, Gaithersburg, MD).

5 Le produit caractérisé par GEPA-DSS présentait quatre bandes de polymère (figure 3A). Elles représentaient environ 58 % avec un poids moléculaire de 120 000, 26 % avec un poids moléculaire de 192 000, 10 11 % avec un poids moléculaire de 256 000 et 4 % avec un poids moléculaire de 320 000. Des traces de polymères de poids moléculaires supérieurs étaient visibles sur le gel. Les figures 3A, 3B et 3C représentent des analyses densitométriques du produit de la présente invention soumis à une séparation par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-DSS en utilisant la technique décrite dans la note 306 de LKB (LKB Instruments, Gaithersburg, MD). L'analyse a été obtenue à partir d'un Helena Quick Scan, R et D (Helena Laboratories, Beaumont, Texas) à différents stades de polymérisation.

20 La viscosité du produit variait avec la polymérisation. Le produit final possédait une viscosité de 3,1 centipoises à une concentration en hémoglobine d'environ 8 g/dl. Cette valeur était comparable à celle du sang entier. La figure 10 décrit la relation entre la concentration en hémoglobine du produit et la viscosité de la solution. Les mesures ont été effectuées avec le viscosimètre Brookfield modèle LVT (Brookfield Engineering Laboratories Inc., Stoughton, MA) à une température de 25°C et une vitesse de cisaillement de 450 s⁻¹.

25 Les phospholipides qui étaient présents dans les membranes des hématies n'étaient pas détectables dans le produit final par chromatographie sur couche mince (CCM). Des traces d'acides gras libres étaient

35

visibles sur les plaques de CCM dans certains lots.

L'activité en méthémoglobine-réductase dans le produit était pratiquement non modifiée par le procédé. Le lysat de départ ainsi que le produit final possé-
5 daient des activités enzymatiques comprises entre 1,0 et 2,0 U. Une unité d'activité enzymatique est définie comme 1 μ m de complexe ferrocyanure-méthémoglobine réduit par gramme d'hémoglobine et par minute.

Exemple 10

10 Essais physiologiques et biologiques

A. Altérations rénales

Des études comparatives conduites chez des babouins non anesthésiés ont indiqué que l'injection intraveineuse lente d'une solution contaminée avec plus
15 de 2 à 3 % d'hémoglobine tétramère a provoqué une chute de production d'urine d'approximativement 50 % et une chute de vitesse de filtration glomérulaire (clairance à la créatinine) d'approximativement 15 %, comparative-
20 ment aux valeurs avant injection intraveineuse lente. L'injection intraveineuse lente d'une solution d'hémo-
globine pyridoxylée polymérisée, pratiquement dépourvue de tétramère, n'a produit aucun effet appréciable.

B. Effets hémodynamiques

Chez des babouins, une chute d'approximative-
25 ment 25 % de la fréquence des pulsations cardiaques et une élévation d'approximativement 14 % de la pression artérielle moyenne ont été associées à l'injection intra-
veineuse lente d'une solution d'hémoglobine contaminée avec plus de 5 à 7 % d'hémoglobine tétramère. Cela était
30 dû à l'activité principalement vasoconstrictrice du tétramère et était absent lorsqu'une solution d'hémo-
globine pyridoxylée polymérisée, pratiquement dépourvue de tétramère, était injectée par voie intraveineuse lente.

C. Extravasation

Une quantité de solution d'hémoglobine tétramère allant jusqu'à 2 litres a été observée dans les cavités abdominales de babouins ayant subi une exsanguino-
5 transfusion à un hématocrite de 0 % avec l'hémoglobine tétramère. Une quantité faible sinon nulle de liquide contenant de l'hémoglobine a été observée dans les cavités péritonéales des animaux ayant subi une exsanguino-
10 transfusion à un hématocrite de 0 % avec une solution d'hémoglobine pyridoxylée polymérisée, pratiquement dépourvue de tétramère.

D. Destruction des antigènes viraux

Un échantillon de 100 unités d'hématies humaines, la matière de départ préférée pour le procédé décrit
15 dans le présent mémoire, répondait positivement à un essai concernant l'antigène de surface de l'hépatite virale B. La destruction de cet antigène s'est produite au bout de 1 à 2 heures de polymérisation, de la manière décrite dans l'exemple 5.

20 E. Réduction de l'hémoglobine présente dans l'urine

L'injection intraveineuse lente à un babouin d'une solution d'hémoglobine contenant de l'hémoglobine tétramère a eu pour résultat l'excrétion d'hémoglobine
25 tétramère dans l'urine. Cela s'est produit lorsque la masse d'hémoglobine tétramère injectée par voie intraveineuse lente a dépassé l'aptitude du babouin à fixer le tétramère d'hémoglobine au moyen de l'haptoglobine circulante. L'urine résultante présentait une couleur rouge foncé caractéristique de l'hémoglobine et contenait
30 1 à 2 g d'hémoglobine pour 100 ml d'urine. Les solutions d'hémoglobine tétramère présentaient une demi-vie de 2 à 4 heures in vivo (les animaux d'essai étant des souris ou des babouins). L'injection intraveineuse lente d'une solution d'hémoglobine pyridoxylée, polymérisée,
35 pratiquement dépourvue d'hémoglobine tétramère (présence

de moins de 2 % de tétramère), a eu pour résultat une modification faible ou non appréciable de la couleur de l'urine (moins de 30 mg d'hémoglobine pour 100 ml d'urine). Une solution d'hémoglobine pyridoxylée polymérisée traitée par de l'haptoglobine (dépourvue de tétramère à plus de 99,5 %) n'a produit aucune variation de la coloration de l'urine, même par injection intraveineuse lente à des doses thérapeutiques très élevées chez le primate.

La demi-vie du produit obtenu par le procédé décrit dans le présent mémoire était approximativement égale à 24 heures (figure 11). La figure 11 décrit la courbe de disparition plasmatique (demi-vie) de l'hémoglobine non modifiée dépourvue de stroma (HDS) et du produit de la présente invention. Un gramme par kilogramme de poids corporel de HDS ou de solution d'hémoglobine pyridoxylée polymérisée, réticulée, pratiquement dépourvue de tétramère, dans de la solution de Ringer au lactate, à une concentration d'hémoglobine d'environ 7 à environ 14 g/dl, a été administré par voie intraveineuse à six babouins mâles adultes. Les teneurs plasmatiques en hémoglobine ont été déterminées au moyen du co-oxymètre IL 282, à des intervalles de 2 heures dans le cas de la HDS ou à des intervalles de six heures dans le cas du produit de la présente invention. Les mesures ont été poursuivies jusqu'à disparition de la totalité de l'hémoglobine du plasma des sujets d'essai.

Il va de soi que la présente invention n'a été décrite qu'à titre explicatif, mais nullement limitatif, et que de nombreuses modifications peuvent y être apportées sans sortir de son cadre.

REVENDEICATIONS

1. Substituant acellulaire des hématies, caractérisé en ce qu'il comprend une hémoglobine pyridoxylée polymérisée, réticulée, pratiquement dépourvue de tétramère et de stroma, et un support non toxique, pharmaceutiquement acceptable.

2. Substituant acellulaire des hématies suivant la revendication 1, caractérisé en ce que l'hémoglobine possède une capacité de transport de l'oxygène normale, comprise entre environ 9,7 % en volume et environ 25 % en volume, est pratiquement dépourvue d'activité vasoconstrictrice, d'agents pathogènes, d'antigènes viraux et d'antigènes microbiens, n'entraîne aucune diminution appréciable de la production d'urine, de la vitesse de filtration glomérulaire, aucune extravasation appréciable dans la cavité péritonéale, aucune variation appréciable de couleur de l'urine produite.

3. Substituant acellulaire des hématies suivant la revendication 1, caractérisé en ce que l'hémoglobine possède un poids moléculaire moyen d'environ 120 000 daltons, une P_{50} d'environ 1,87 kPa à environ 2,93 kPa, une pression oncotique d'environ 0,93 kPa à environ 4,0 kPa, une osmolarité d'environ 290 mOsM à environ 310 mOsM et une teneur en hémoglobine d'environ 7 g/dl à environ 18 g/dl.

4. Utilisation d'un substituant acellulaire des hématies suivant la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle consiste à administrer par voie intraveineuse ledit substituant en une quantité pharmaceutiquement efficace à un mammifère souffrant d'un trauma ou d'anémie aiguë.

5. Utilisation d'un substituant acellulaire des hématies suivant la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle consiste à administrer par voie intra-

veineuse ledit substituant en une quantité pharmaceutiquement efficace à un mammifère dont la maladie ou l'état médical nécessite un liquide de réanimation ou un agent augmentant le volume intravasculaire.

5 6. Utilisation d'un substituant acellulaire des hématies suivant la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle consiste à administrer par voie intraveineuse ledit substituant en une quantité pharmaceutiquement efficace à un mammifère dont la maladie ou l'état
10 médical nécessite une exsanguino-transfusion, et à remplacer le sang dudit mammifère par ledit substituant acellulaire des hématies.

 7. Utilisation d'un substituant acellulaire des hématies suivant la revendication 1, caractérisée
15 en ce qu'elle consiste à administrer par voie intraveineuse ledit substituant en une quantité pharmaceutiquement efficace à un mammifère souffrant d'un déficit en oxygène, qu'il s'agisse d'une hypoxie ou d'une hypoxémie.

20 8. Procédé de préparation d'une hémoglobine pyridoxylée polymérisée, réticulée, pratiquement dépourvue de tétramère et de stroma, caractérisé en ce qu'il consiste à séparer le stroma érythrocytaire du sang, à effectuer une pyridoxylation et une polymérisation,
25 et à éliminer pratiquement la totalité du tétramère non modifié restant.

 9. Procédé suivant la revendication 8, caractérisé en ce que la pyridoxylation consiste à ajouter
30 une solution contenant du pyridoxal-5'-phosphate à de l'hémoglobine extraite, à effectuer une désoxygénation, à ajouter une solution contenant un agent réducteur, à mélanger, de préférence pendant une durée d'environ 30 minutes à environ 10 heures, jusqu'à obtention d'un rendement d'environ 70 % à environ 90 % en hémoglobine
35 désoxygénée pyridoxylée, puis à éliminer les réactifs

en excès, de préférence par dialyse.

10. Procédé suivant la revendication 8, caractérisé en ce que la pyridoxylation consiste à ajouter une solution contenant du pyridoxal-5'-phosphate à de l'hémoglobine extraite, à effectuer une désoxygénation, à faire passer par pompage en continu une solution contenant un agent réducteur d'un premier réservoir à une première paroi d'une membrane semi-perméable, de préférence une membrane de dialyse rénale, à faire passer par pompage en continu la solution d'hémoglobine désoxygénée contenant du pyridoxal-5'-phosphate d'un second réservoir à une seconde paroi de ladite membrane, à laisser diffuser une partie dudit agent réducteur à travers ladite membrane, à effectuer la pyridoxylation de l'hémoglobine sur la seconde paroi, à renvoyer une portion n'ayant pas diffusé de ladite solution contenant un agent réducteur dans le premier réservoir et à renvoyer la solution d'hémoglobine désoxygénée contenant de l'hémoglobine pyridoxylée désoxygénée dans le second réservoir.

11. Procédé suivant la revendication 8, caractérisé en ce que la polymérisation consiste à exposer l'hémoglobine désoxygénée pyridoxylée à une solution de polymérisation, de préférence pendant une durée d'environ 2 heures à environ 7 heures, jusqu'à ce que la pression oncotique atteigne environ 5,33 kPa, et à éliminer les réactifs en excès, de préférence par dialyse.

12. Procédé suivant la revendication 11, caractérisé en outre en ce qu'il consiste à ajouter un agent de polymérisation à la solution de polymérisation toutes les heures, respectivement en des quantités d'environ 70 ml à environ 80 ml la première heure, d'environ 45 ml à environ 55 ml la deuxième heure, d'environ 45 ml à environ 55 ml la troisième heure, d'environ 45 ml à environ 55 ml la quatrième heure, d'environ 45 ml à environ 55 ml la cinquième heure, d'environ

20 ml à environ 30 ml la sixième heure et d'environ 5 ml à environ 15 ml la septième heure ; et, à la huitième heure, à éliminer les réactifs en excès, de préférence par dialyse.

5 13. Procédé suivant la revendication 8, caractérisé en ce que la polymérisation consiste à faire passer par pompage en continu une solution de polymérisation d'un premier réservoir à une première paroi latérale d'une membrane semi-perméable, de préférence une
10 membrane de dialyse rénale, à faire passer par pompage en continu la solution d'hémoglobine pyridoxylée désoxygénée d'un second réservoir à une seconde paroi de ladite membrane, à faire diffuser une partie de ladite solution de polymérisation à travers la membrane, à polymériser
15 l'hémoglobine pyridoxylée sur ladite seconde paroi, à renvoyer une portion non diffusée de ladite solution de polymérisation dans le premier réservoir et à renvoyer la solution d'hémoglobine pyridoxylée polymérisée dans ledit second réservoir.

20 14. Procédé suivant la revendication 11 ou 13, caractérisé en ce que la solution de polymérisation contient environ 14,8 moles à environ 18,1 moles de glutaraldéhyde par mole d'hémoglobine.

25 15. Procédé suivant la revendication 8, caractérisé en ce que l'élimination de pratiquement la totalité du tétramère non modifié restant consiste en une filtration et une purification.

30 16. Procédé suivant la revendication 8, caractérisé en ce que l'élimination de pratiquement la totalité du tétramère non modifié restant consiste en un pompage d'une solution polymérisée à travers des cartouches d'ultrafiltration à fibres creuses, une purification par chromatographie sur gel et un traitement avec de l'haptoglobine, avantageusement par addition
35 d'haptoglobine ou bien réaction avec de l'haptoglobine liée à un gel.

17. Procédé suivant la revendication 8, caractérisé en ce que l'élimination de pratiquement la totalité du tétramère non modifié restant consiste à pomper une solution polymérisée à travers des cartouches d'ultrafiltration à fibres creuses et à purifier par chromatographie sur gel.

18. Procédé suivant la revendication 8, caractérisé en ce que l'élimination de pratiquement la totalité du tétramère non modifié restant consiste à pomper une solution polymérisée à travers des cartouches d'ultrafiltration à fibres creuses et à effectuer un traitement avec de l'haptoglobine, avantageusement par addition d'haptoglobine ou réaction avec de l'haptoglobine liée à un gel.

19. Procédé suivant la revendication 8, caractérisé en ce que l'élimination de pratiquement la totalité du tétramère non modifié restant consiste à effectuer une purification par chromatographie sur gel et à effectuer un traitement avec de l'haptoglobine, avantageusement par addition d'haptoglobine ou réaction avec de l'haptoglobine liée à un gel.

20. Procédé suivant la revendication 8, caractérisé en ce que l'élimination de pratiquement la totalité du tétramère non modifié consiste en une purification par chromatographie sur gel.

21. Procédé suivant la revendication 8, caractérisé en ce que l'élimination de pratiquement la totalité du tétramère non modifié restant consiste en un traitement avec de l'haptoglobine, avantageusement par addition d'haptoglobine ou réaction avec de l'haptoglobine liée à un gel.

22. Procédé suivant la revendication 8, caractérisé en ce que le procédé donne le substituant acellulaire des hématies suivant la revendication 1, pratiquement dépourvu d'agents pathogènes, d'antigènes microbiens et d'antigènes viraux.

Fig. 2

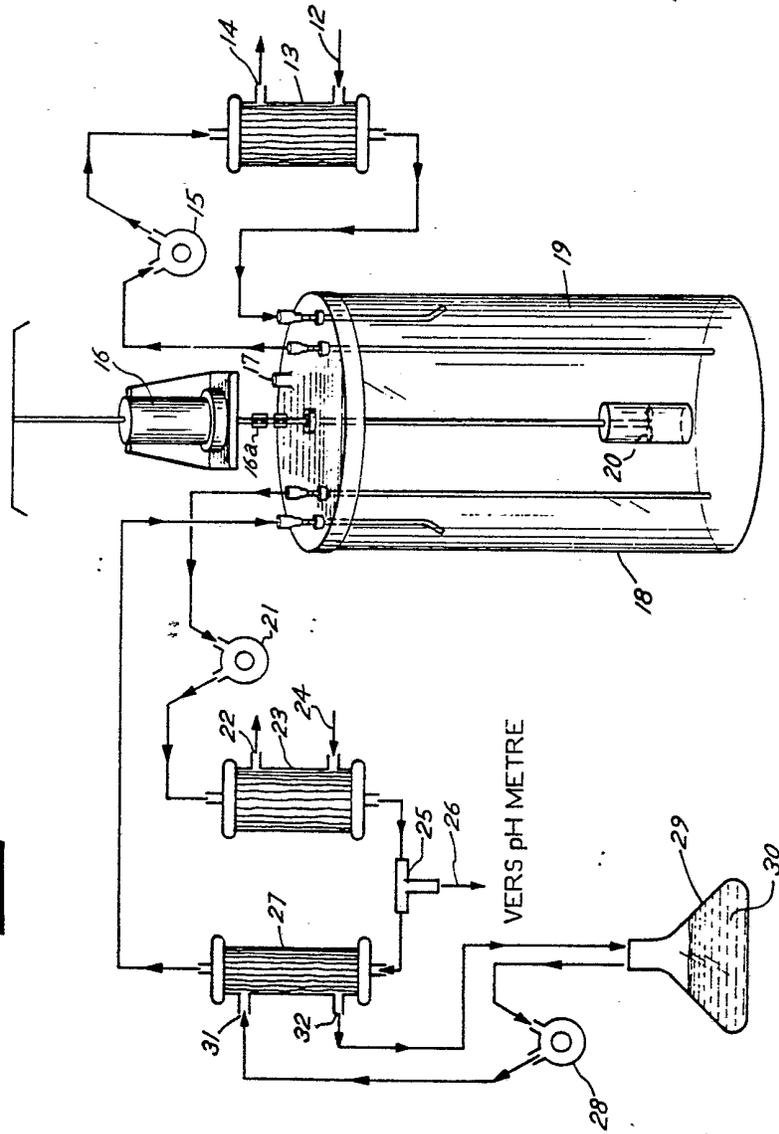


Fig. 3A

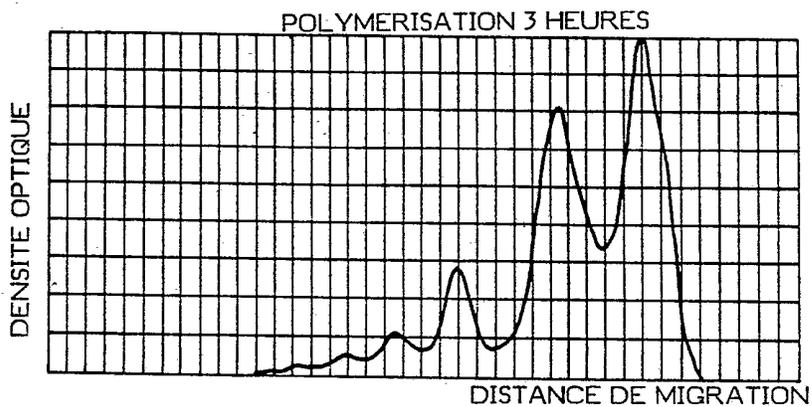


Fig. 3B

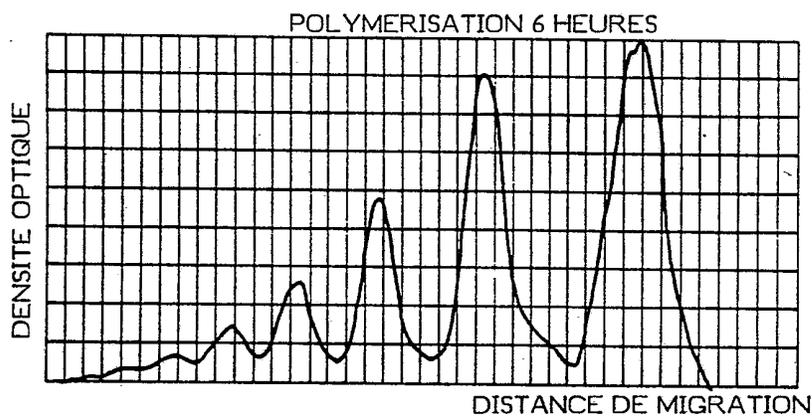


Fig. 3C

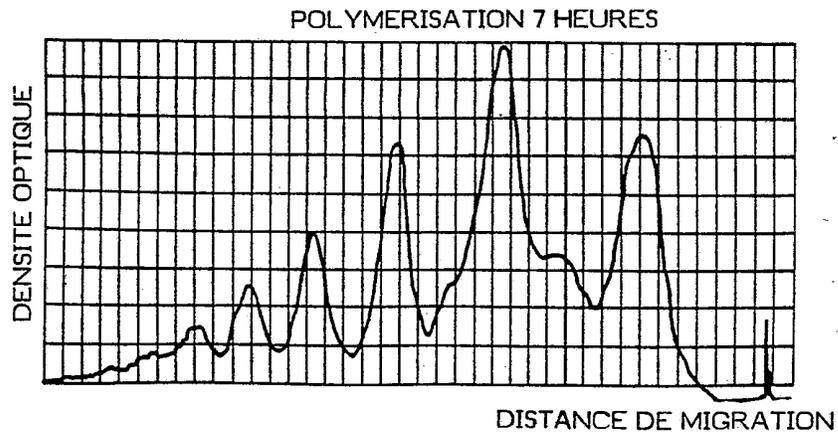


Fig. 4

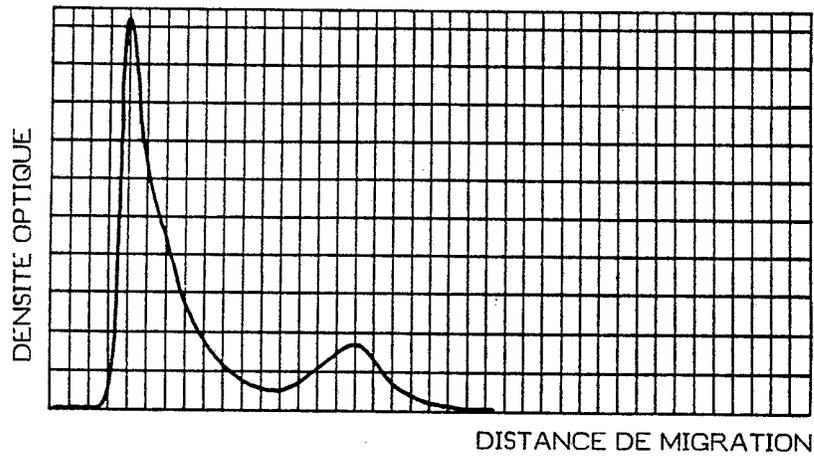


Fig. 5

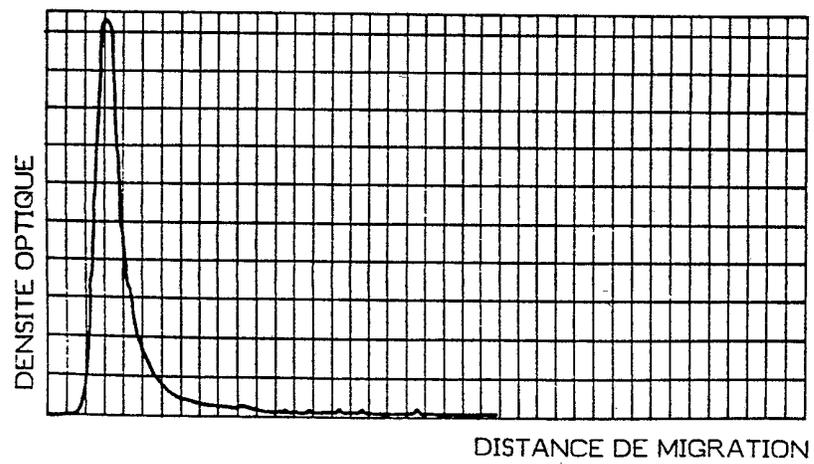


Fig. 6A

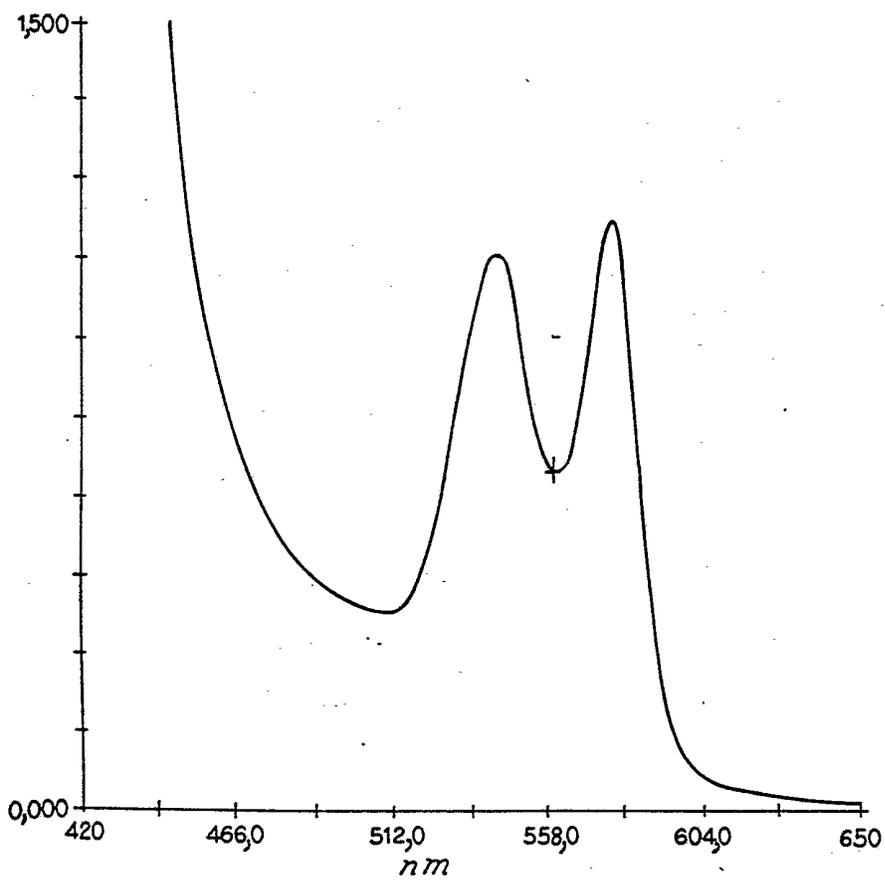


Fig. 6B

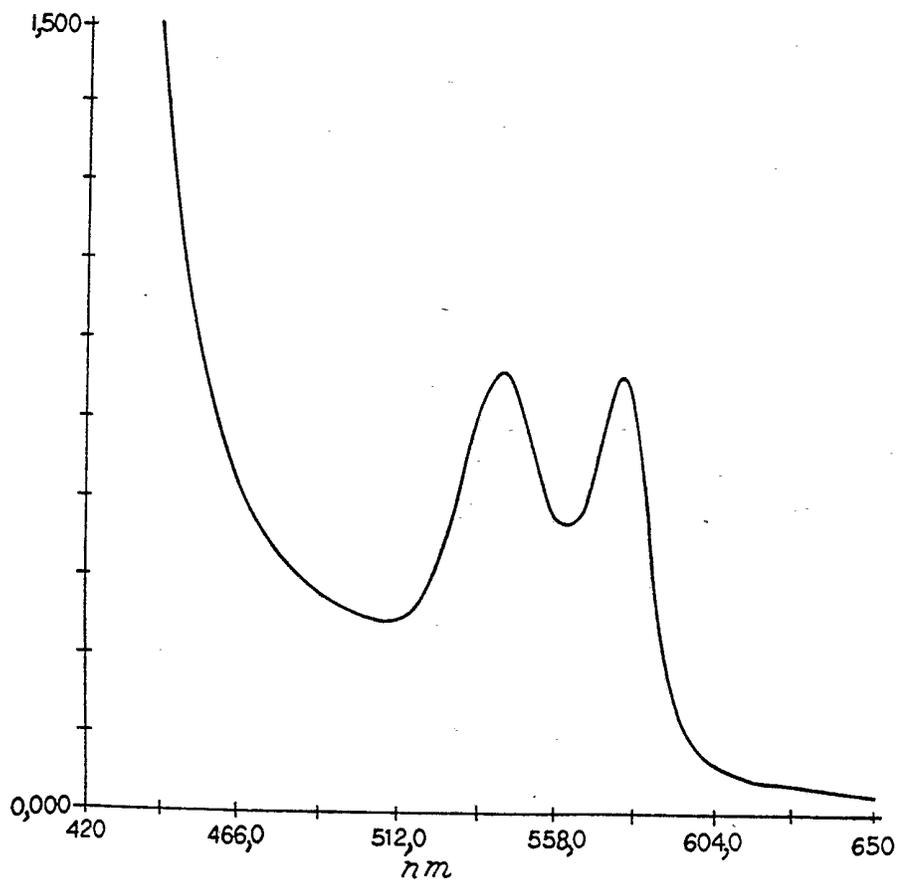


Fig. 7

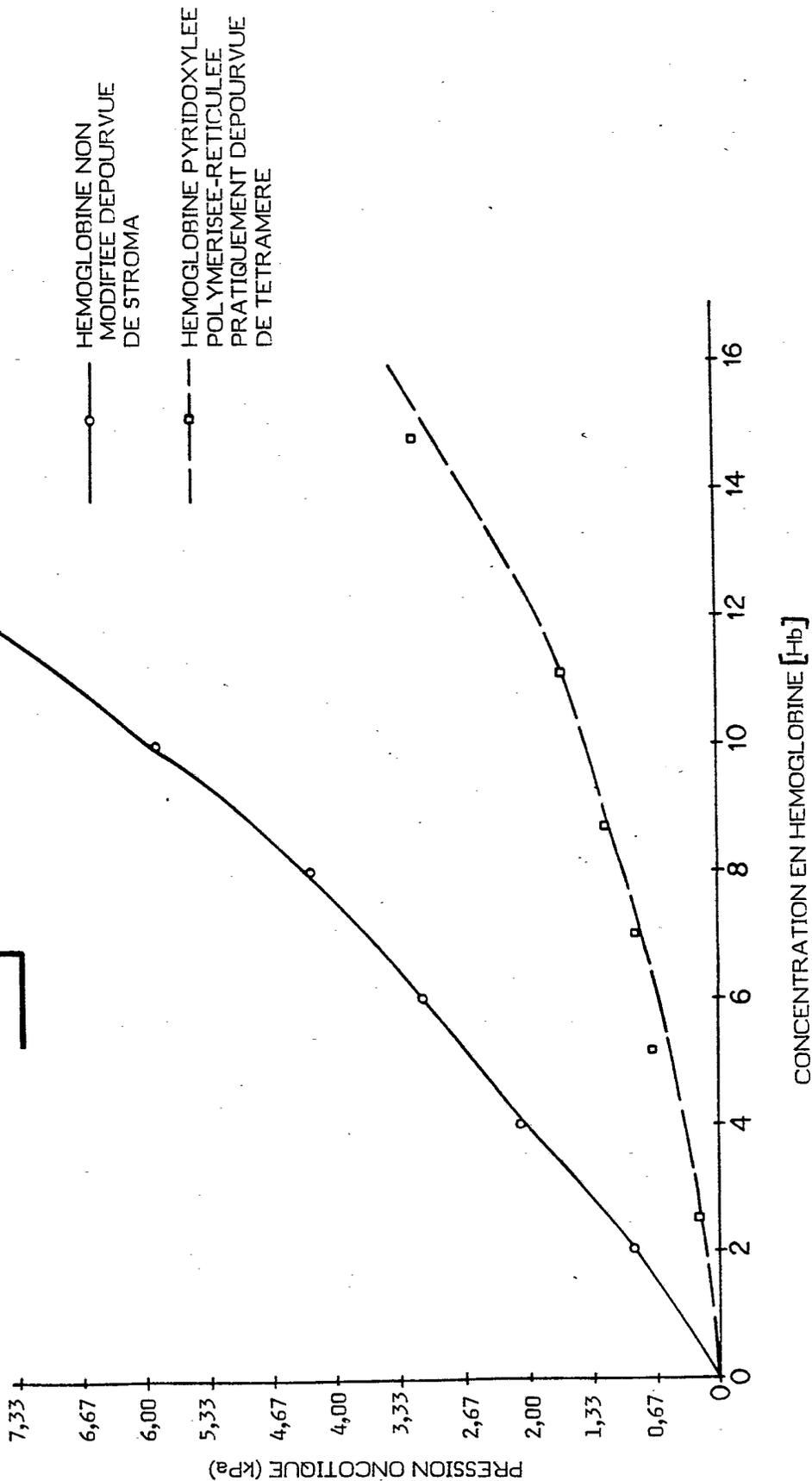


Fig. 8

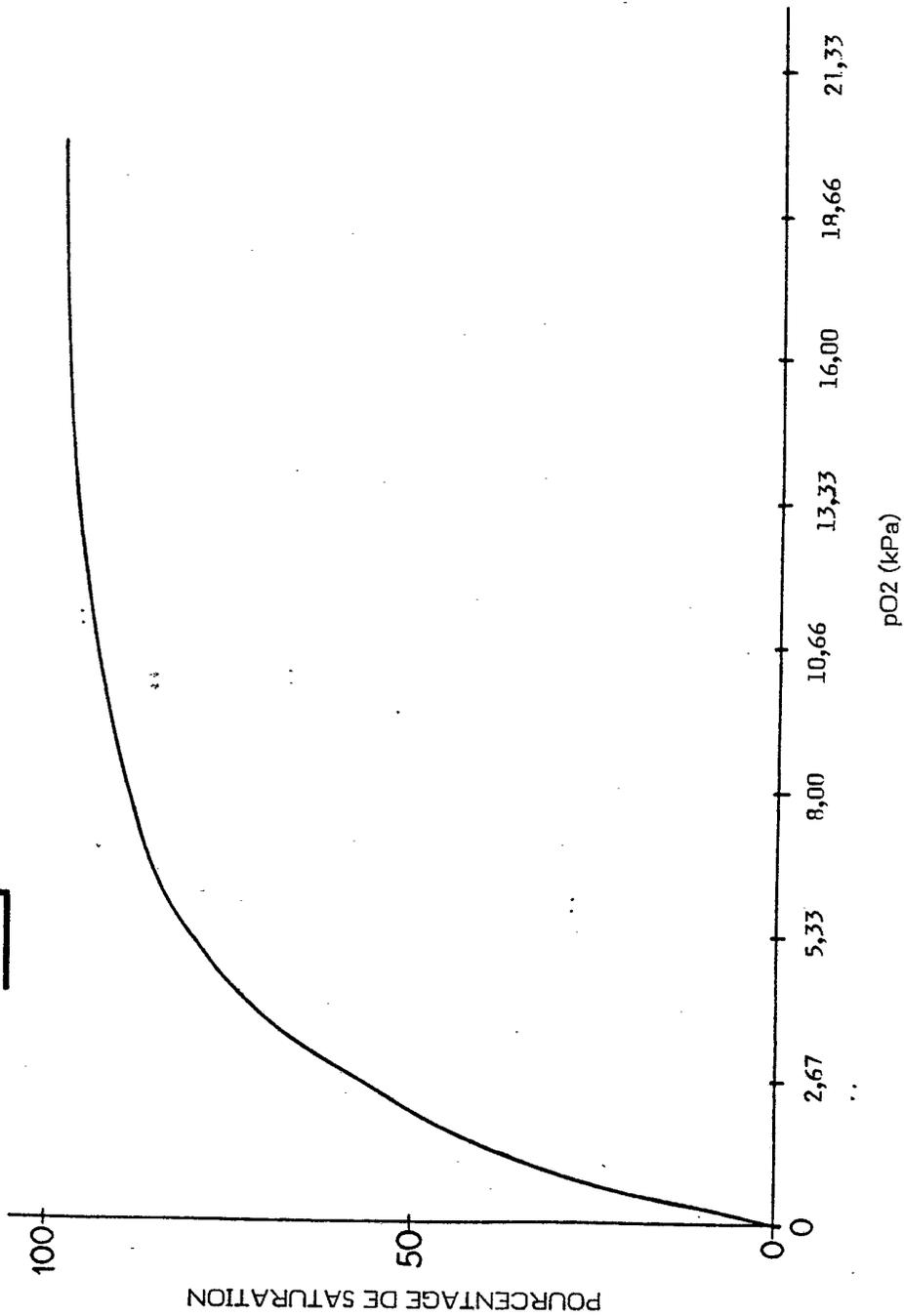


Fig. 9

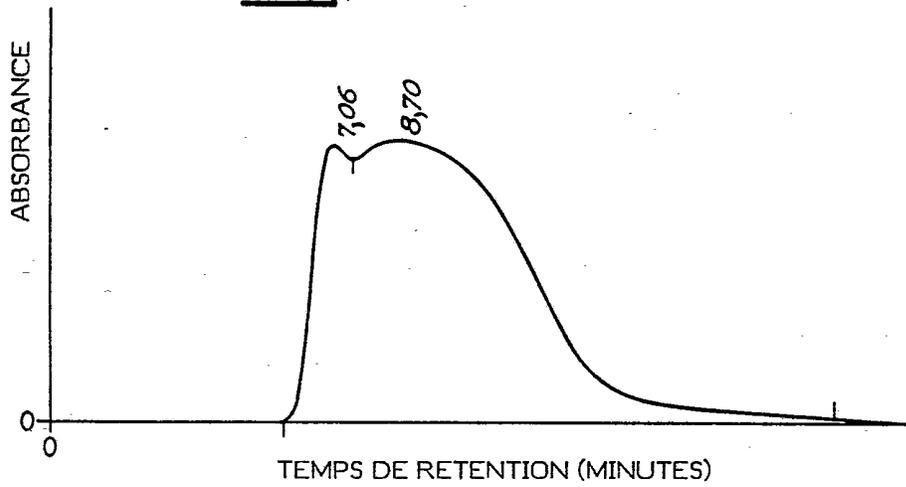
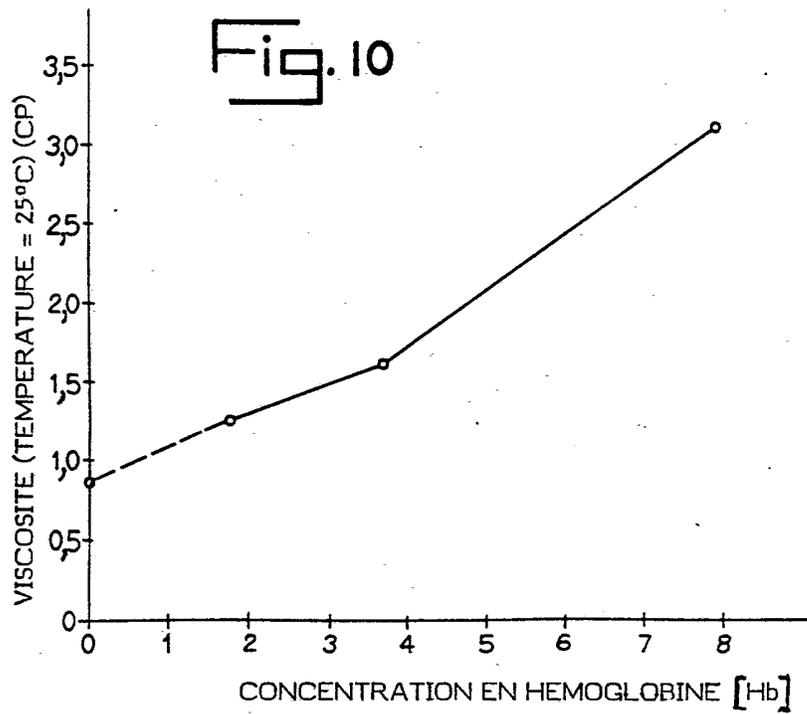


Fig. 10



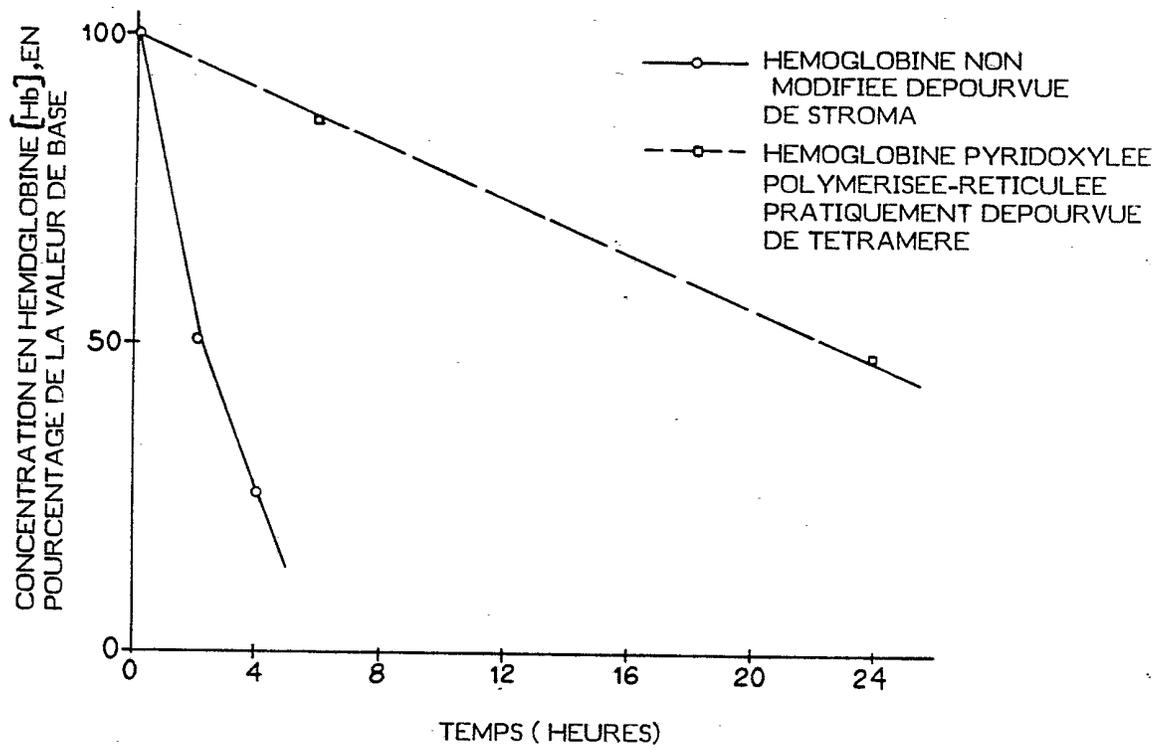


Fig. II