

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

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

2 460 138

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

⑫

N° 79 17217

⑭ Préparation antithrombinique et son procédé de fabrication.

⑮ Classification internationale (Int. Cl.³). A 61 K 37/64.

⑯ Date de dépôt..... 3 juillet 1979.

⑰ ⑱ ⑲ Priorité revendiquée :

⑳ Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 4 du 23-1-1981.

㉑ Déposant : Société dite : THE GREEN CROSS CORPORATION, résidant au Japon.

㉒ Invention de : Yahiro Uemura, Midori Nagatomo, Satoshi Funakoshi et Tadakazu Suyama.

㉓ Titulaire : *Idem* ㉑

㉔ Mandataire : La Société de Protection des Inventions,
25, rue de Ponthieu, 75008 Paris.

La présente invention se rapporte à une préparation anti-thrombinique sèche contenant de l'antithrombine-III d'origine humaine comme ingrédient principal, et à son procédé de fabrication.

Il est bien connu que la thrombine ayant une action
5 coagulante agit sur la fibrine en donnant un monomère fibri-
nique, lequel se polymérise en formant un réseau de fibres
de fibrine, cependant que le réseau emprisonne des corpuscules
du sang pour donner un thrombus grâce auquel les saignements
sont stoppés.

10 Bien que la thrombine existe habituellement dans les
organismes vivants sous forme de prothrombine inactive, elle
peut quelquefois être activée progressivement en donnant de
la thrombine. Cependant, la thrombine est neutralisée par les
antithrombines qui existent simultanément dans l'organisme
15 vivant, de sorte que la coagulation du sang ne se produit pas
immédiatement.

Dans les cas de coagulation intravasculaire disséminée
(DIC) et de fibronopénie, l'activation de la prothrombine dans
l'organisme vivant est accélérée de façon anormale et elle
20 dépasse l'action neutralisante de l'antithrombine, ce qui
entraîne la coagulation du sang et la formation de thrombi
dans divers endroits de l'organisme.

En conséquence, on peut remédier à des anomalies
telles que la DIC en renforçant l'action de l'antithrombine.
25 Comme substance ayant une activité antithrombique in vivo,
on citera l'antithrombine-III, la fibrine et ses produits de
décomposition, l' α_2 -macroglobuline etc. ; parmi ceux-ci, l'anti-
thrombine-III présente l'activité la plus élevée, de sorte qu'il
est souhaitable de produire une préparation stable de celle-ci.

30 L'antithrombine-III dont il est question
ici est une substance capable d'inactiver la
thrombine humaine. Elle peut être obtenue à partir du sang
entier, du plasma ou du sérum humain. Le sérum exprimé à
partir de sang coagulé contient cette substance, qui ne peut
35 pas coaguler le fibrinogène purifié.

Comme procédés de purification de l'antithrombine-III,
on citera le procédé d'absorption sur hydroxyde d'aluminium,
la chromatographie par échange d'ions sur DEAE-cellulose, et
la méthode d'absorption héparine-séphalose (brevet japonais

Kokai n° 35017/1973, brevet des U.S.A. n° 3 842 061). Bien que l'antithrombine-III obtenue par ces procédés soit relativement stable à l'état liquide, la perte d'antithrombine-III est assez importante lors de la congélation ou de la lyophilisation qui sont généralement considérés comme des procédés très efficaces pour la stabilisation à long terme des protéines etc.

Comme l'antithrombine-III présente une certaine stabilité à l'état liquide, il est possible de produire une préparation liquide d'antithrombine-III. Mais la préparation liquide est peu souhaitable car l'activité de la préparation liquide diminue après un stockage prolongé et il se dépose dans certains lots une matière insoluble.

Bien qu'on ait déjà signalé plusieurs procédés de purification de l'antithrombine-III comme ci-dessus, on n'a pas encore mis au point de procédé de production d'une préparation médicale à partir de celle-ci, ce qui résulte de ce qu'il n'existe aucune technique de stabilisation du produit purifié pendant une durée prolongée.

La demanderesse a effectué une étude détaillée d'un procédé pour transformer l'antithrombine-III en une préparation, et du procédé de stabilisation de l'antithrombine-III au cours de la lyophilisation. A la suite de cette étude, la demanderesse a découvert un stabilisant utilisable à ces effets et elle a développé une préparation d'antithrombine contenant une antithrombine-III lyophilisée comme ingrédient principal sous une forme sûre et stabilisée pour une durée prolongée. La présente invention est basée sur ce succès.

Un des buts de l'invention est de fournir une préparation d'antithrombine sèche contenant comme ingrédient principal de l'antithrombine-III, laquelle est sûre, stable pendant une durée prolongée, et un procédé pour sa production.

D'autres buts et avantages de l'invention ressortiront de la description ci-dessous.

Conformément à l'invention, il est fourni une préparation d'antithrombine stable, sèche contenant de l'antithrombine-III d'origine humaine.

L'invention fournit aussi une préparation d'antithrombine

sèche contenant de l'antithrombine III comme ingrédient principal et une quantité efficace d'au moins une espèce de stabilisant choisi parmi les protéines, les sucres, les amino-acides, les sels minéraux et les sels d'acides organiques.

5 En outre, conformément à l'invention, il est fourni un procédé de production d'une préparation d'antithrombine sèche caractérisé en ce qu'on lyophilise une solution aqueuse d'antithrombine-III d'origine humaine en présence d'une
10 quantité efficace d'au moins une espèce de stabilisant choisi parmi le groupe constitué des protéines, des sucres, des amino-acides, des sels minéraux et des sels organiques.

L'antithrombine-III utilisée dans l'invention peut être n'importe quelle antithrombine-III qui a été purifiée par l'un quelconque des procédés décrits jusqu'à
15 une pureté de 30 % ou davantage, et l'antithrombine-III elle-même n'est pas particulièrement limitée.

Le stabilisant utilisé pour le traitement de lyophilisation de l'antithrombine-III doit être un stabilisant physiologiquement acceptable. Comme exemples de ces stabilisants,
20 on citera des sels minéraux tels que le chlorure de sodium, le chlorure de potassium, le phosphate de sodium, le phosphate de potassium, le bicarbonate de sodium etc. ; des sels organiques tels que le citrate de sodium, le citrate de potassium, l'acétate de sodium, l'oxalate de potassium etc. ; des
25 protéines comme l'albumine, la globuline, le fibrinogène, l'urokinase, le plasminogène, la gélatine etc.; des sucres comme le mannitol, le glucose, le saccharose, l'héparine etc. ; et des amino-acides tels que la glycine, la lysine etc. Ces stabilisants ont également une action stabilisante dans le
30 traitement thermique d'inactivation du virus de l'hépatite, qui peut être contenu dans l'antithrombine-III.

On peut obtenir une quantité efficace de chaque stabilisant en ajoutant 0,1 à 5,0 parties en poids du stabilisant à une solution aqueuse contenant une partie en poids d'anti-
35 thrombine-III. Parmi les stabilisants ci-dessus, les protéines, les sucres et les amino-acides peuvent également servir d'excipient de la préparation, de sorte que leur utilisation en combinaison avec d'autres stabilisants est favorable.

Lorsqu'on utilise deux espèces de stabilisants ou davantage dans le mélange, la quantité totale des additifs peut être dans l'intervalle mentionné ci-dessus.

5 Pour utiliser ces stabilisants, on dissout une quantité déterminée de ceux-ci dans une solution aqueuse d'antithrombine-III ayant une concentration et un pH appropriés. La concentration de la solution obtenue doit être dans l'intervalle de 0,1 à 3 fois la concentration d'isotonique, et être de préférence égal à la concentration isotonique. Le ph de la 10 solution aqueuse doit être ajusté à 6,2-9,0, de préférence à 7-8.

La solution aqueuse contenant l'antithrombine-III et le stabilisant est soumise à un traitement thermique (60°C, 10 heures) pour inactiver le virus de l'hépatite, ou à une 15 filtration stérilisante ou aux deux, si nécessaire, après quoi on la divise en portions égales à l'unité de conditionnement, de telle sorte qu'un conditionnement contienne 1 000 à 100 000 unités d'antithrombine-III. Puis la solution divisée est lyophilisée rapidement, ce qui fournit une préparation plus 20 virulente.

La préparation sèche d'antithrombine-III ainsi obtenue contient 0,1 à 5,0 parties en poids de stabilisant pour une partie en poids d'antithrombine-III.

25 Lorsqu'on applique la préparation de l'invention à un patient ayant une DIC ou une fibrinopénie, on en fait une solution contenant environ 1 à 10 % P/V d'antithrombine-III avec de l'eau distillée pour injections, ou mieux en une solution ayant une concentration en sels physiologiquement isotonique, puis on administre la solution par voie intra- 30 veineuse. Bien que la dose puisse être choisie de façon appropriée en fonction des besoins, la préparation est généralement utilisée sous la forme de l'unité de conditionnement. La préparation de l'invention ne perd pas son activité du tout au cours du traitement de lyophilisation, et elle a une 35 stabilité dans le temps tellement élevée qu'elle reste entièrement stable après avoir été stockée à 37°C pendant environ 24 mois. Par conséquent, elle est très intéressante dans le domaine médical en tant que préparation antithrombine contenant de l'antithrombine-III comme ingrédient principal.

Les concentrations de l'antithrombine-III indiquées dans la description et les revendications ci-après ont été déterminées en faisant réagir un échantillon avec de la thrombine à 23°C pendant 5 mn, en mesurant la prolongation du temps de coagulation provoquée par l'addition de fibrinogène au mélange réactionnel, et en calculant la concentration à partir de celui-ci en se référant à une courbe de calibrage préalablement établie. A ce moment, l'unité et l'activité de l'antithrombine est choisie pour des raisons de commodité, de telle sorte qu'une activité antithrombinique d'un liquide surnageant obtenue par traitement thermique d'un plasma humain normal à 56°C pendant 3 mn, puis en défibrinant le produit de la réaction, soit égal à 100 unités/ml.

Dans le présent mémoire et les revendications, P/V % ainsi que le pourcentage de poids unitaire du soluté par volume unitaire de solution aqueuse.

Les exemples non limitatifs suivants sont donnés à titre d'illustration de l'invention.

Exemple 1.

On met en suspension 10 kg de la fraction pâteuse IV-1 obtenue par la méthode de fractionnement à l'alcool froid de Chon dans 100 l de solution de chlorure de sodium physiologique. On ajoute à la suspension 5 % P/V de sulfate de sodium et on agite le mélange à la température ambiante pendant 30 mn, de telle sorte que la faible quantité de prothrombine présente dans le mélange est absorbée sur le sulfate de barium et éliminée. On ajoute au liquide surnageant 13 % P/V de polyéthylèneglycol 4000, on élimine le précipité formé par centrifugation, on y ajoute 30 % P/V supplémentaire de polyéthylèneglycol 4000 et on recueille le précipité formé par centrifugation.

On dissout le précipité dans environ 20 l d'une solution de chlorure de sodium physiologique froid et on le verse dans une colonne d'héparine séphalose préalablement préparée pour y faire absorber l'antithrombine-III. On lave la colonne avec une solution 0,4 M de chlorure de sodium pour éliminer les protéines présentes comme impuretés, après quoi on verse sur la colonne une solution 2,0 M de chlorure de sodium et on recueille l'éluat sous forme de fraction d'anti-

thrombine-III. Le rendement est de 510×10^4 unités, et le taux de récupération est d'environ 50 % par rapport à la matière de départ. On dialyse une nuit la solution aqueuse de l'anti-thrombine-III purifiée ainsi obtenue contre 0,5 % P/V de citrate de sodium et 0,4 % P/V de chlorure de sodium ce qui fournit une solution aqueuse à 1 % P/V d'antithrombine-III. On ajoute 1 % P/V d'albumine humaine, on soumet le mélange à une filtration stérilisante au moyen d'un filtre millipore stérile, et on divise le filtrat en portions de 50 000 unités, puis on le lyophilise pour obtenir les préparations sèches.

Après lyophilisation, le titre est de 50 000 unités, ce qui indique qu'aucune perte de titre ne s'est produite à la suite de la lyophilisation. La préparation ne présente ni perte de titre ni détérioration de la solubilité même après repos à 37°C pendant 24 mois, ce qui démontre son extrême stabilité. Lorsqu'on dissout cette fraction lyophilisée dans de l'eau distillée pour injection et que l'on administre une quantité de la solution correspondant à 40 000 unités/kg à 5 souris à travers la veine de la queue on n'observe aucune anomalie sur les 7 jours qui suivent. Lorsqu'on administre la même solution que ci-dessus à des rats domestiques à la dose de 5 000 unités/kg, on n'observe aucune modification anormale de la température du corps sur les 24 h suivantes.

Exemple 2.

On chauffe à 56°C pendant 3 mn un litre de plasma humain normal et on élimine la fibrine déposée par purification. On mélange le liquide surnageant avec 5 % P/V de sulfate de barium et on l'agite pendant 1 h, après quoi on élimine le sulfate de baryum par centrifugation. On soumet le liquide surnageant à un traitement d'absorption sur de l'hydroxyde d'aluminium conformément au procédé Monkhouse et al., puis on l'élue, ce qui donne une antithrombine-III semi-purifiée. On verse l'éluat dans une colonne de DEAE-cellulose préalablement équilibrée avec une solution tampon d'acécate 0,02 M, pour faire absorber l'antithrombine-III sur la colonne. On lave la colonne avec la même solution tampon que ci-dessus, puis on la soumet à une élution par gradient de concentration avec du

chlorure de sodium 1 M pour recueillir une fraction ayant une activité d'antithrombine-III élevée. On obtient $2,3 \times 10^4$ unités. On ajoute du citrate de sodium à la solution aqueuse d'antithrombine-III, de façon à ce que la concentration de citrate de sodium soit de 0,6 M et on ajuste son pH à 7,8, après quoi on la chauffe à 60°C pendant 10 h pour y activer le virus de l'hépatite, puis on la dialyse une nuit contre une solution 0,9 % de chlorure de sodium, après quoi on la soumet à une séparation centrifuge, ce qui donne une solution limpide.

On mélange cette solution aqueuse à 1 % P/V d'antithrombine-III à 2 % P/V de mannitol et 0,2 % P/V de citrate de sodium, on dilue le mélange avec une faible quantité d'eau distillée froide, de telle sorte que la concentration en chlorure de sodium soit de 0,5 % P/V, on ajuste le pH de la dilution à 7,6 avec de l'hydroxide de sodium 1 N, on la soumet à une filtration stérilisante au moyen d'un filtre Millipore stérile, et on divise le filtrat en portions de 5 000 unités, puis on le lyophilise pour obtenir des préparations sèches.

La préparation à un titre de 4 950 unités après la lyophilisation, ce qui indique qu'il ne s'est pas produit de perte de titre observable. Elle ne présente aucune modification de solubilité ni perte de titre même après repos à la température ambiante pendant 24 mois ou davantage.

De la même manière qu'à l'exemple 1, on administre à des souris 10 000 unités/kg et on observe les animaux pendant 7 jours. Ceux-ci ne présentent aucune anomalie, et leur poids corporel augmente normalement, ce qui démontre la sécurité de la préparation. On administre la même solution que ci-dessus à des lapins domestiques à la dose de 2 000 unités/kg. On n'observe aucune anomalie sur les 24 h suivantes.

Exemple 3.

On ajoute à la solution aqueuse à 1 % P/V l'antithrombine-III purifiée obtenue dans l'exemple 1, 1 % P/V de glycine, 0,2 % P/V de chlorure de sodium et 1 % P/V d'albumine humaine. Après avoir ajusté le pH du mélange à 7,2, on le soumet à une filtration stérilisante au moyen d'un filtre millipore stérile, on le répartit en 50 millipartitions et le lyophilise pour obtenir des préparations sèches. Après séchage, on n'observe aucune perte de

titre et la solubilité reste bonne.

Exemple 4.

On ajoute à la solution aqueuse à 1 % P/V d'antithrombine-III purifiée obtenue à l'exemple 1, 0,5 % P/V (5 000 unités/ml) d'urokinase (fabriquée par la Green Cross Corporation), 0,3 % P/V de chlorure de sodium et 1 % P/V de mannitol. Après avoir ajusté le pH du mélange 7,2, on le soumet à une filtration stérilisante au moyen d'un filtre millipore stérile, on le divise en portions de 50 000 unités, et le lyophilise pour obtenir des préparations sèches. Après séchage, on n'observe aucune perte de titre et la solubilité reste bonne. L'activité de l'antithrombine-III est stable même après repos à 37°C pendant 24 mois.

Exemple 5.

On obtient une préparation sèche en répétant le mode opératoire de l'exemple 4, excepté que l'on remplace l'urokinase par de l'héparine à 0,1 % P/V. Après séchage, on observe aucune perte de titre et la solubilité reste bonne. L'activité de l'antithrombine-III est stable même après repos à 37°C pendant 24 mois.

Exemple expérimental.

En utilisant une antithrombine-III qui a été purifiée et récupérée conformément à l'exemple 1, on compare expérimentalement les stabilités dans le temps obtenues par addition de divers stabilisants. Ainsi, dans cette expérience, une masse liquide d'antithrombine-III est mélangée à divers tranquillisants et lyophilisée, puis on étudie les taux d'activité résiduelle juste après séchage et après un laps de temps d'une année, en prenant l'activité avant séchage comme égale à 100. On prépare les échantillons en ajustant 10 ml d'une solution aqueuse contenant 50 000 unités d'antithrombine-III (0,5 % P/V) à pH 7,5-7,7, et en y ajoutant divers stabilisants dans les proportions indiquées dans le tableau suivant. Les résultats de ces expériences sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau

Stabilisant et proportion	Taux d'activité résiduel			
	aussitôt après séchage	au bout de 3 mois	au bout de 6 mois	au bout de 12 mois
Albumine (1%)	100	100	100	100
Albumine (1%) et chlorure de sodium (0,5%)	108	103	100	100
Chlorure de sodium (1%)	101	101	102	101
Albumine (1%) et citrate de sodium (0,4%)	100	103	102	100
Citrate de sodium (1,0%)	100	100	101	102
Mannitol (1%)	100	103	101	100
Mannitol (1%) et oxalate de potassium (0,5%)	100	100	101	101
Gélatine (1%)	101	101	102	102
Lysine (1,5%)	100	100	100	101
Albumine (1%) et citrate de sodium (0,4%) et chlorure de sodium (0,5%)	102	103	103	102
Aucun	67	60	0	0

REVENDEICATIONS

1. Préparation d'antithrombine sèche contenant une quantité efficace d'antithrombine-III et une quantité efficace d'au moins un membre du groupe constitué par les protéines, les sucres, les amino-acides, les sels minéraux et les sels d'acides organiques comme stabilisant.
5
2. Préparation d'antithrombine sèche suivant la revendication 1, caractérisée en ce que la quantité de ces stabilisants est de 0,1 à 5,0 parties en poids pour une partie en poids d'antithrombine-III.
- 10 3. Préparation d'antithrombine sèche suivant la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle a été traitée thermiquement pour inactiver le virus de l'hépatite.
- 15 4. Préparation d'antithrombine sèche suivant la revendication 1 caractérisée en ce que ce stabilisant est un mélange d'au moins un membre choisi dans le groupe constitué des protéines, des sucres, et des amino-acides, et d'au moins un membre choisi dans le groupe constitué des sels minéraux et des sels d'acides organiques.
- 20 5. Préparation d'antithrombine sèche suivant la revendication 4, caractérisée en ce que la quantité de stabilisant choisie dans le groupe constitué des protéines, des sucres et des amino-acides est suffisante pour qu'ils jouent le rôle d'excipient.
- 25 6. Préparation d'antithrombine sèche suivant la revendication 1, caractérisée en ce que cette protéine ait au moins un membre choisi dans le groupe constitué de l'albumine, la globuline, le fibrinogène, l'urokinase, le plasminogène et la gélatine.
- 30 7. Préparation d'antithrombine sèche suivant la revendication 1 caractérisée en ce que ce sucre ait au moins un membre choisi dans le groupe constitué du mannitol, du glucose, du saccharose et de l'héparine.
- 35 8. Préparation d'antithrombine sèche suivant la revendication 1, caractérisée en ce que cet amino-acide ait au moins un membre choisi dans un groupe constitué de la glycine et de la lysine.

9. Préparation d'antithrombine sèche selon la revendication 1, caractérisée en ce que ce sel minéral ait au moins un membre choisi dans le groupe constitué du chlorure de sodium, du chlorure de potassium, du phosphate de sodium, du phosphate de potassium et du bicarbonate de sodium.

10. Préparation d'antithrombine sèche suivant la revendication 1 caractérisée en ce que ce sel d'acide organique ait au moins un membre choisi dans le groupe constitué des sels de l'acide citrique, des sels de l'acide acétique et des sels de l'acide oxalique.

11. Procédé de fabrication d'une préparation d'antithrombine sèche, caractérisé en ce qu'on lyophilise une solution aqueuse contenant de l'antithrombine-III comme constituant principal en présence d'une quantité efficace d'au moins un membre choisi dans le groupe constitué des protéines, des sucres, des amino-acides, des sels minéraux et des sels organiques comme stabilisant.

12. Procédé suivant la revendication 11, caractérisé en ce que le pH de cette solution aqueuse est de 6,2-9,0.

13. Procédé suivant la revendication 11, caractérisé en ce que cette solution aqueuse contenant ce stabilisant et l'antithrombine-III est soumise à un traitement thermique avant la lyophilisation pour inactiver le virus de l'hépatite.

14. Procédé suivant la revendication 11, caractérisé en ce que la solution aqueuse contenant ce stabilisant et l'antithrombine-III est une solution dont la concentration est de 0,1-3,0 fois la concentration isotonique.

15. Utilisation de la préparation d'antithrombine sèche suivant la revendication 1 pour le traitement de la DIC et de la fibrinopénie.