(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

COURBEVOIE

(11) **N° de publication :** ***3 035 120***
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) **N° d'enregistrement national :** **15 53347**

(51) Int Cl[8] : ***C 12 N 11/02*** *(2015.01), A 61 K 35/16, A 61 K 38/48, A 61 P 27/02*

(12) **BREVET D'INVENTION** **B1**

(54) COMPOSITION DE PLASMINOGENASE IMMOBILISEE, PROCEDE DE PREPARATION, UTILISATION ET DISPOSITIF COMPRENANT UNE TELLE COMPOSITION.

(22) **Date de dépôt :** 15.04.15.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 21.10.16 Bulletin 16/42.

(45) **Date de la mise à disposition du public du brevet d'invention :** 07.02.20 Bulletin 20/06.

(56) **Liste des documents cités dans le rapport de recherche :**

Se reporter à la fin du présent fascicule

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

◯ **Demande(s) d'extension :**

(71) **Demandeur(s) :** *ARCADOPHTA Société à responsabilité limitée* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** REBOUL GERARD, SAUX Carine et OUARNE FRANCOISE.

(73) **Titulaire(s) :** ARCADOPHTA Société à responsabilité limitée.

(74) **Mandataire(s) :** CABINET BARRE LAFORGUE & ASSOCIES.

FR 3 035 120 - B1

COMPOSITION DE PLASMINOGÉNASE IMMOBILISÉE, PROCÉDÉ DE PRÉPARATION, UTILISATION ET DISPOSITIF COMPRENANT UNE TELLE COMPOSITION

L'invention concerne une composition enzymatique comprenant une plasminogénase immobilisée sur un support solide, un procédé de préparation d'une telle composition enzymatique, l'utilisation d'une telle composition enzymatique pour la préparation d'un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine et un dispositif comprenant une telle composition enzymatique.

L'invention concerne en particulier une composition enzymatique et un dispositif comprenant une telle composition enzymatique qui sont adaptés pour pouvoir être utilisés dans le cadre d'un traitement d'une pathologie chez un patient dans lequel une composition autologue enrichie en plasmine autologue est requise, par exemple dans le cadre d'une pathologie cardiovasculaire ou dans le cadre d'une intervention chirurgicale, en particulier lors d'une intervention chirurgicale intravitréale en ophtalmologie.

Certaines indications pathologiques en ophtalmologie telles que les tractions vitréo-maculaires (TVM) génèrent des trous maculaires créés par des contraintes en traction tangentielle différentielle survenant entre le corps vitré et la rétine. Le traitement de ces pathologies nécessite de libérer la rétine de ces contraintes. Les traitements connus sont principalement de nature chirurgicale visant à séparer mécaniquement la rétine et le corps vitré.

On connaît aussi de WO2010/125148 un traitement d'un détachement de la rétine en traction (en anglais « *tractional retinal detachment* ») dans lequel on administre dans l'humeur vitrée d'un patient, une composition stérile obtenue par addition d'urokinase hétérologue à du plasma du patient. Cette composition stérile comprend de l'urokinase hétérologue et est susceptible de poser un problème de réaction immunologique chez le patient.

On connaît aussi (Gondorfer et al., (2004), Investigative Ophtalmology & Visual Science, *45 ;2*, 641-647. *Posterior Vitreous Detachment*

Induced by Microplasmin) une composition injectable comprenant une protéine recombinante formée du domaine catalytique de la plasmine et l'effet de l'injection d'une telle composition injectable à l'interface vitréo-rétinale d'yeux humains *ex vivo* ou d'yeux de chat *in vivo*.

Une telle protéine recombinante est cependant complexe dans sa fabrication. La présence de protéine recombinante hétérologue dans une telle composition injectable conduit à un problème de réaction immunitaire chez le patient recevant cette composition injectable. En outre, le coût de cette composition injectable est élevé, de sorte que des solutions alternatives à l'utilisation de protéines recombinantes sont recherchées, avec lesquelles les risques de réaction immunitaire seraient aussi minimisés.

L'invention vise donc à résoudre l'ensemble de ces problèmes.

En particulier, l'invention vise à proposer une composition enzymatique, un procédé de préparation et l'utilisation d'une telle composition enzymatique, et un dispositif comprenant une telle composition enzymatique qui permettent de convertir *ex vivo* du plasminogène d'un milieu plasmatique sanguin en plasmine sous l'effet de la composition enzymatique. L'invention permet de préparer un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine exempt d'enzyme hétérologue ou ne présentant qu'une quantité résiduelle d'enzyme hétérologue libre minimale et en particulier insuffisante pour provoquer une réaction immunitaire lors de la mise en contact -notamment par injection- dudit milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine au contact de tissu(s) d'un patient.

L'invention vise à proposer une composition enzymatique, un procédé de préparation et l'utilisation d'une telle composition enzymatique, et un dispositif comprenant une telle composition enzymatique adaptés pour permettre une conversion rapide -notamment en une durée comprise entre 15 min et 60 min à 37°C- de plasminogène d'un milieu plasmatique sanguin en plasmine.

Pour ce faire, l'invention concerne une composition enzymatique comprenant :

- au moins une enzyme, dite plasminogénase, de conversion en plasmine de plasminogène d'un milieu plasmatique sanguin comprenant du plasminogène ;
- un support solide insoluble en solution aqueuse,

caractérisée en ce que ladite plasminogénase est liée au support solide et reste liée à ce support au contact d'un milieu plasmatique sanguin,

et en ce que le support solide présente des dimensions adaptées pour pouvoir être retenu sur un filtre présentant un seuil de coupure inférieur ou égal à 0,22 µm.

Dans tout le texte, on adopte la terminologie suivante :

- l'expression « milieu plasmatique sanguin » désigne tout milieu liquide exempt de cellules sanguines viables et résultant directement d'un traitement de fractionnement de sang -notamment de sang humain- liquide non coagulé, dans des conditions adaptées pour permettre une séparation des cellules sanguines (hématies, leucocytes, plaquettes) et du milieu plasmatique sanguin exempt de cellules sanguines viables. On peut réaliser une telle séparation par exemple par centrifugation ou par tri cellulaire dans un procédé de micro-fluidique ;
- l'expression « milieu plasmatique *ex vivo* » désigne tout milieu plasmatique sanguin extrait du corps humain ou animal ;
- le terme « plasminogénase » désigne toute enzyme présentant une activité de conversion de plasminogène en plasmine par clivage d'une liaison peptidique du plasminogène, et ;
- l'expression « liaison stable » désigne l'ensemble des forces assurant, dans des conditions prédéterminées, la cohésion entre des groupements d'atomes, en particulier entre le support solide et au moins une plasminogénase lorsque la composition enzymatique est mise en contact par immersion à une température de l'ordre de 37°C dans un milieu plasmatique sanguin ;
- l'expression «sensiblement » indique, de façon habituelle, qu'une caractéristique structurelle -telle qu'une valeur- ou fonctionnelle, ne doit pas être prise comme marquant une discontinuité abrupte, qui n'aurait pas de sens physique, mais couvre non seulement cette structure ou cette fonction, mais également des

variations légères de cette structure ou de cette fonction qui produisent, dans le contexte technique considéré, un effet de même nature, sinon de même degré.

L'invention concerne une composition enzymatique comprenant au moins une plasminogénase immobilisée sur un support solide à l'état divisé, ladite composition enzymatique étant adaptée pour pouvoir :

- être mise en contact avec un milieu plasmatique sanguin ;
- permettre une conversion en plasmine d'au moins une partie du plasminogène du milieu plasmatique sanguin sous l'action de ladite plasminogénase ;
- être séparée du milieu plasmatique sanguin enrichi en plasmine par filtration sur une membrane ou filtre présentant un seuil de coupure inférieur ou égal à 0,22 µm.

La composition enzymatique selon l'invention ne libère pas dans le milieu plasmatique sanguin mis en contact avec la composition enzymatique une quantité significative de plasminogénase libre. La composition enzymatique selon l'invention est donc susceptible d'être utilisée dans un procédé de préparation d'un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine sensiblement exempt de plasminogénase hétérologue, à partir d'un milieu plasmatique sanguin formé à partir de sang prélevé sur un patient. Un tel milieu plasmatique *ex vivo* autologue, riche en plasmine et sensiblement exempt de plasminogénase hétérologue est destiné à être utilisé chez ce même patient.

L'inventeur a observé qu'il est possible d'immobiliser au moins une plasminogénase sur un support solide à l'état divisé insoluble en solution aqueuse tout en conservant une activité plasminogénase. Une telle composition enzymatique permet d'une part de convertir de façon efficace du plasminogène d'un milieu plasmatique sanguin en plasmine et d'autre part une séparation facilitée de la composition enzymatique et d'un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine obtenu par mise en contact d'un milieu plasmatique sanguin et de la composition enzymatique, en limitant -notamment en évitant totalement- une libération intempestive significative de plasminogénase dans ce milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine. Le milieu

plasmatique *ex vivo* riche en plasmine est donc sensiblement exempt de plasminogénase exogène et hétérologue.

Avantageusement et selon l'invention, les particules présentant trois dimensions s'étendent selon trois directions orthogonales entre elles, au moins deux des trois dimensions étant supérieures à 0,22 µm.

Avantageusement et selon l'invention, chaque dimension des particules est supérieure à 0,22 µm.

Avantageusement et selon l'invention, au moins deux des dimensions des particules du support solide à l'état divisé sont comprises entre 1 µm et 500 µm, notamment comprises entre 10 µm et 500 µm, de préférence comprises entre 100 µm et 500 µm. Avantageusement et selon l'invention, chaque dimension des particules du support solide à l'état divisé est comprise entre 1 µm et 500 µm, notamment comprise entre 10 µm et 500 µm, de préférence comprise entre 100 µm et 500 µm. Avantageusement, les dimensions des particules du support solide à l'état divisé sont choisies de façon que la composition enzymatique soit retenue sur un filtre de stérilisation, c'est à dire sur un filtre présentant un seuil de coupure inférieur ou égal à 0,22 µm.

Avantageusement et selon l'invention, le support solide est formé d'un matériau poreux. Avantageusement et selon l'invention, le matériau poreux présente des pores de diamètre moyen compris entre 5 nm et 50 nm, de préférence compris entre 10 nm et 20 nm. Avantageusement, le matériau poreux est choisi dans le groupe formé des matériaux rigides. Avantageusement et selon l'invention, le support solide est formé d'un matériau choisi dans le groupe formé des matériaux de surface spécifique élevée.

Avantageusement et selon l'invention, le support solide -notamment le support solide à l'état divisé- est formé d'un matériau choisi dans le groupe formé des polymères poly-glucosides et des polymères poly-méthacryliques, notamment des copolymères poly-méthacryliques, par exemple des copolymères poly(glycidyle méthacryliques (GMA)/éthylène diméthacrylique (EDMA).

Avantageusement et selon l'invention, le support solide est formé des supports SEPABEADS® EC-HFA/S et GE Healthcare Epoxy-activated Sepharose™. Avantageusement, le support solide à l'état divisé est formé de particules sphériques de diamètre moyen compris entre 100 µm et 300 µm.

Avantageusement et selon l'invention, au moins une plasminogénase -notamment chaque plasminogénase- est une endopeptidase à sérine -notamment une endopeptidase à activité antithrombotique- de la classe EC 3.4.21 de la classification des enzymes.

Avantageusement et selon l'invention, au moins une plasminogénase -notamment chaque plasminogénase- est choisie dans le groupe formé d'une urokinase, d'une streptokinase, d'une nattokinase et d'un activateur tissulaire du plasminogène (t-PA). Avantageusement et selon l'invention, au moins une plasminogénase est l'urokinase U0633 (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Avantageusement et selon l'invention, la composition enzymatique comprend une plasminogénase unique. En variante, la composition enzymatique peut comprendre une pluralité de différentes plasminogénases en mélange.

Avantageusement et selon l'invention, au moins une plasminogénase est liée au support solide par au moins une liaison stable choisie dans le groupe formé d'une liaison covalente, d'une liaison ionique, d'une liaison covalente de coordination (ou liaison dative) et d'une interaction hydrophobe de type van der Waals.

Avantageusement et selon l'invention, au moins une liaison stable est choisie pour résister à une mise en contact avec une solution aqueuse de NaCℓ à une concentration de 0,5 M.

Avantageusement et selon l'invention, au moins une plasminogénase -notamment chaque plasminogénase- est liée au support solide par au moins une liaison covalente. En particulier, au moins une telle liaison covalente est formée par réaction chimique entre un groupe amine libre de ladite plasminogénase et un groupement époxy du support solide.

Avantageusement et selon des modes alternatifs de réalisation de l'invention, la composition enzymatique comprend une plasminogénase unique ou un mélange d'une pluralité de plasminogénases.

Avantageusement et selon l'invention, la composition enzymatique est adaptée pour pouvoir former, par mise en contact d'une composition enzymatique selon l'invention et d'un milieu plasmatique sanguin, un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine qui est sensiblement apyrogène. Une composition enzymatique selon l'invention est adaptée pour ne pas libérer de composé hétérologue -notamment de plasminogénase hétérologue- dans un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine obtenu par mise en contact de la composition enzymatique et d'un milieu plasmatique sanguin -notamment à une température de l'ordre de 37°C-, ledit composé hétérologue étant susceptible d'induire une réaction immunitaire chez un sujet traité avec une quantité de ce milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine.

On analyse le caractère pyrogène/apyrogène du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine obtenu par mis en contact d'un milieu plasmatique sanguin et d'une composition enzymatique selon l'invention par la mesure de la température corporelle de lapins ayant reçu une injection de milieu plasmatique *ex vivo* autologue riche en plasmine. L'absence d'augmentation de la température corporelle des lapins suite à l'injection traduit le caractère apyrogène du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine.

Avantageusement et selon l'invention, la composition enzymatique est exempte de tout germe microbien, en particulier de tout germe microbien pathogène. Avantageusement et selon l'invention, la composition enzymatique est stérile.

Avantageusement et selon l'invention, la composition enzymatique est à l'état de poudre déshydratée. La composition enzymatique peut être conservée à l'état sec et déshydraté ; elle est adaptée pour pouvoir être mise directement en contact avec un milieu plasmatique sanguin, notamment sans adjonction

d'eau ou de solution aqueuse (telle que de l'eau pour solution injectable ou de sérum physiologique).

Avantageusement et selon l'invention, chaque plasminogénase est liée au support solide de façon à n'introduire dans un milieu plasmatique sanguin en contact duquel la composition enzymatique est placée qu'une masse de plasminogénase libre inférieure à 400 µg, ledit contact étant réalisé selon le procédé ci-après :

- on mélange à température de l'ordre de 37°C une masse comprise entre 0,01 g et 0,5 g -notamment de l'ordre de 0,1 g- de composition enzymatique à l'état déshydraté avec un volume compris entre 0,5 mL et 1,0 mL -notamment de l'ordre de 0,7 mL- de milieu plasmatique sanguin, puis ;
- on maintient le contact pendant une durée supérieure à 5 min -notamment comprise entre 5 min et 60 min-, puis ;
- on sépare la composition enzymatique et le milieu plasmatique sanguin par filtration sur un filtre présentant un seuil de coupure inférieur ou égal à 0,22 µm, et ;
- on mesure la masse de plasminogénase libérée dans le milieu plasmatique sanguin.

Avantageusement et selon l'invention, la masse de plasminogénase libre dans le milieu plasmatique sanguin en contact duquel la composition enzymatique est placée est inférieure à 200 µg, notamment inférieure à 100 µg, de préférence inférieure à 50 µg.

Avantageusement et selon l'invention, la masse de plasminogénase libre dans le milieu plasmatique sanguin en contact duquel la composition enzymatique est placée est inférieure à 20 µg, notamment inférieure à 15,0 µg, en particulier inférieure à 8,0 µg, de préférence inférieure à 3,0 µg, plus préférentiellement inférieure à 1,5 µg-.

On réalise le dosage de la plasminogénase libérée par toute méthode adaptée, par exemple par dosage immuno-enzymatique quantitatif de type

« ELISA » » en utilisant un anticorps primaire spécifique de la plasminogénase et un anticorps secondaire quantifiable et en réalisant une courbe d'étalonnage à partir de de solutions contenant des quantités connues de plasminogénase dans du milieu plasmatique sanguin.

Il est aussi possible de détecter une activité plasminogénase libérée dans le milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine par une méthode indirecte en analysant la variation temporelle de l'activité plasmine du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine obtenu après élimination par filtration de la composition enzymatique. Dans des conditions non limitantes de concentration en plasminogène, la quasi-stabilité de l'activité plasmine traduit l'absence de plasminogénase libre dans le milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine, alors qu'une augmentation sensible de l'activité plasmine peut traduire la présence de plasminogénase libre dans le milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine.

La composition enzymatique selon l'invention permet de former un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine qui est faiblement immunogène.

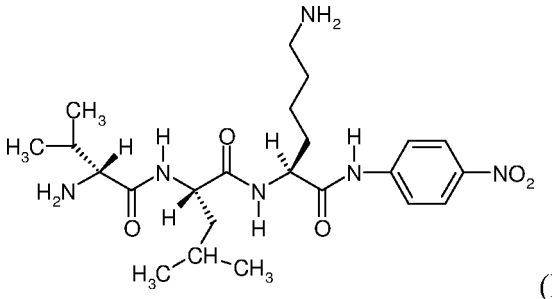
Avantageusement et selon l'invention, la composition enzymatique présente une activité, dite activité plasminogénase, de conversion en plasmine de plasminogène d'un milieu plasmatique sanguin au contact duquel elle est placée dans les conditions suivantes :

- on met une masse comprise entre 0,01 g et 0,5 g -notamment de l'ordre de 0,1 g- de ladite composition enzymatique à l'état déshydraté en contact à température de l'ordre de 37°C pendant une durée supérieure à 5 min -notamment comprise entre 5 min et 60 min- avec un volume compris entre 0,5 mL et 1,0 mL -notamment de l'ordre de 0,7 mL- de milieu plasmatique sanguin, et
- on forme un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine, présentant, après séparation par filtration de la composition enzymatique et du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine une activité enzymatique initiale, dite activité plasmine, telle que mesurée par un test de libération de *para*-nitro-aniline supérieure à 0,1 µmole -notamment comprise entre 0,1 et 0,3 µmole, de

préférence de l'ordre de 0,2 µmole- de *para*-nitro-aniline libérée par minute et par millilitre (mL) de milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine,

ledit test de libération consistant à :

- mélanger dans le milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine maintenu à la température de 37°C un substrat chromogène S-2251 de formule (I) ci-après :



(I),

à une concentration initiale de l'ordre de 1 mM (c'est-à-dire 10^{-3} mole/L) dans le milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine,

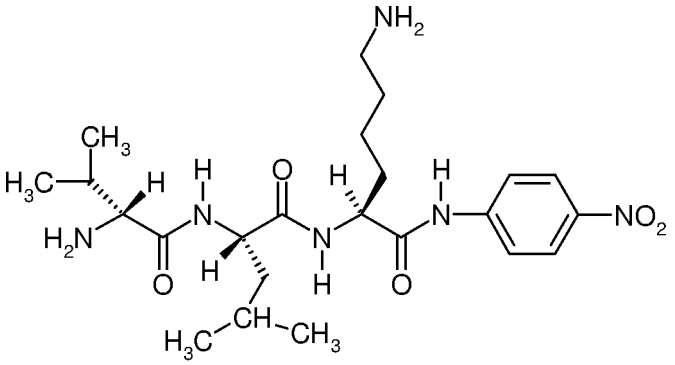
- évaluer la vitesse initiale de libération de *para*-nitro-aniline (en µmole de de *para*-nitro-aniline) par minute et par millilitre (mL) de milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine suite au mélange.

On mesure l'activité plasmine d'un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine obtenu par mise en contact d'un milieu plasmatique sanguin et d'une composition enzymatique selon l'invention par une méthode indirecte dans laquelle on place une quantité de composition enzymatique en contact avec une quantité de milieu plasmatique sanguin comprenant du plasminogène à 37°C pendant une durée comprise entre 5 min et 60 min et dans des conditions adaptées pour permettre une conversion de plasminogène du milieu plasmatique sanguin en plasmine et la formation d'un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine.

On réalise ensuite une étape de séparation -notamment par filtration stérilisante- de la composition enzymatique et du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine formé par conversion de plasminogène du milieu plasmatique sanguin en plasmine. Avantageusement, il est possible de réaliser cette étape de filtration stérilisante en une seule étape de filtration sur filtre présentant un seuil de

coupure inférieur ou égal à 0,22 µm. Cependant, il est aussi possible de de réaliser cette étape de filtration stérilisante en plusieurs étapes comprenant une première filtration de séparation de la composition enzymatique et du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine, la première filtration étant non stérilisante, puis une deuxième filtration du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine exempte de composition enzymatique, ladite deuxième filtration étant une filtration stérilisante sur filtre présentant un seuil de coupure inférieur ou égal à 0,22 µm.

On détermine l'activité plasmine du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine. En pratique, on prépare dans une cuve de mesure spectrophotométrique un milieu de mesure de l'activité plasmine par mélange à 37°C d'un volume de milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine et de ce même volume d'une solution aqueuse d'un substrat chromogène -par exemple du S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA•2HCℓ, Chromogenix, Le Pré Saint Gervais, FRANCE) de formule (IV) ci-après :



(IV) ;

à titre de substrat chromogène à une concentration de l'ordre de 2 mM (de sorte que la concentration du S-2251 soit de l'ordre de 1 mM dans le milieu de mesure)- susceptible de libérer de la *para*-nitro-aniline sous l'action de la plasmine du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine. Á compter du mélange, on mesure l'évolution de l'absorbance (densité optique, DO_{405nm}) à 405 nm du milieu de mesure maintenu à 37°C pendant 5 minutes. On évalue la pente à l'origine de la courbe d'évolution temporelle de l'absorbance à 405 nm, c'est-à-dire la vitesse initiale Vi de la réaction

exprimée en Δ_{abs} / min. L'activité plasmine (exprimée en U/mL de milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine) est donnée par la formule (II) ci-après :

$$\text{Activité plasmine} = \frac{Vi * Vm * 10^3}{\varepsilon * L * Vp}, \qquad \text{(II)}$$

dans laquelle :

- Vi est la vitesse initiale de la réaction exprimée en Δ_{abs} / min ;
- Vm est le volume (en mL) total du milieu de mesure ;
- ε est le coefficient d'extinction moléculaire (en $M^{-1}.cm^{-1}$) de la *para*-nitro-aniline à 405 nm ;
- L est la longueur (en cm) du trajet optique de la cuve de mesure spectrophotométrique, et ;
- Vp est le volume (en mL) de milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine introduit dans la cuve de mesure spectrophotométrique.

Le cas échéant, on mesure à titre de contrôle l'activité plasmine basale d'un milieu plasmatique sanguin non enrichi en plasmine en remplaçant dans le protocole ci-dessus le milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine par le même volume de milieu plasmatique sanguin duquel est issu le milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine. On déduit de la valeur d'activité plasmine du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine la valeur d'activité plasmine basale ainsi calculée.

L'invention s'étend également à un procédé de préparation d'une composition enzymatique selon l'invention.

L'invention concerne aussi un procédé de préparation d'une composition enzymatique selon l'invention, dans lequel :

- on choisit au moins une enzyme, dite plasminogénase, de conversion en plasmine de plasminogène d'un milieu plasmatique sanguin comprenant du plasminogène;
- on choisit un support solide insoluble en solution aqueuse ;
    - adapté pour pouvoir former avec chaque plasminogénase une liaison stable au contact d'un milieu plasmatique sanguin, et ;

- o présentant des dimensions adaptées pour pouvoir être retenu sur un filtre présentant un seuil de coupure inférieur ou égal à 0,22 µm, et ;
- on met en contact le support solide et chaque plasminogénase de façon à lier chaque plasminogénase au support solide.

Avantageusement et selon l'invention, on immobilise chaque plasminogénase sur le support solide par simple mise en contact de chaque plasminogénase en solution liquide avec le support solide. Pour ce faire on immerge le support solide dans une solution liquide -notamment aqueuse- de chaque plasminogénase, que l'on maintient sous agitation pendant une durée suffisante pour permettre la formation de la composition enzymatique et conserver l'activité de la (des) plasminogénase(s).

Avantageusement et selon l'invention, on choisit des conditions -notamment des conditions de température- qui sont adaptées pour former la composition enzymatique.

Avantageusement et selon l'invention, on choisit au moins une plasminogénase -notamment chaque plasminogénase- dans le groupe formé des endopeptidases à sérine -notamment des endopeptidases à activité antithrombotique- de la classe EC 3.4.21 de la classification des enzymes..

Avantageusement et selon un premier mode de réalisation de l'invention, on choisit un support solide à l'état divisé et formé de particules présentant trois dimensions s'étendant selon trois directions orthogonales entre elles, au moins deux desdites trois dimensions étant supérieures à 0,22 µm. Avantageusement et selon l'invention, chaque dimension des particules est supérieure à 0,22 µm.

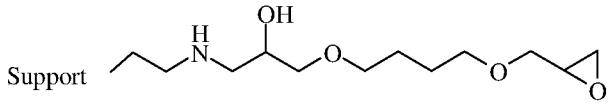
Avantageusement et selon l'invention, on choisit le support solide dans le groupe des supports solides à l'état divisé présentant des particules de forme sensiblement sphérique et de diamètre supérieur à 0,22 µm. Un tel support solide est donc susceptible de pouvoir être retenu sur des dispositifs de filtration présentant une taille maximale de perméation de 0,22 µm.

Avantageusement et selon l'invention, au moins deux des trois dimensions des particules du support solide à l'état divisé sont comprises entre 1 µm et 500 µm, notamment comprises entre 10 µm et 500 µm, de préférence comprises entre 100 µm et 500 µm. Avantageusement et selon l'invention, chaque dimension des particules du support solide à l'état divisé est comprise entre 1 µm et 500 µm, notamment comprise entre 10 µm et 500 µm, de préférence comprise entre 100 µm et 500 µm.

Avantageusement et selon l'invention, on choisit un support solide à l'état divisé susceptible de pouvoir être retenu par un dispositif de séparation par filtration présentant un seuil de coupure de l'ordre de 0,22 µm, par exemple un dispositif de séparation par filtration comprenant un filtre en polytétrafluoréthylène (PTFE) ou en polyfluorure de vinylidène (PVDF).

Avantageusement et selon l'invention, le support solide à l'état divisé est formé d'un matériau comprenant au moins un ligand de surface apte à former au moins une liaison stable -notamment au moins une liaison covalente- avec au moins une plasminogénase.

Avantageusement et selon l'invention, au moins un ligand de surface comprend un groupement époxy. Avantageusement et selon l'invention, au moins un ligand de surface est un groupement amino-époxyde lié au support solide et de formule (III) ci-après :



(III).

Avantageusement et selon l'invention, le matériau du support solide -notamment du support solide à l'état divisé- est choisi dans le groupe formé des poly-glycosides fonctionnalisés et des polymères méthacrylates fonctionnalisés. Avantageusement et selon l'invention, le matériau du support solide à l'état divisé est choisi dans le groupe formé des poly-glycosides fonctionnalisés en surface par au moins un groupement époxy et des polymères méthacrylates fonctionnalisés en surface par au moins un groupement époxy.

Avantageusement, le support solide à l'état divisé est choisi dans le groupe formé des supports SEPABEADS® EC-HFA/S -dont le diamètre moyen des particules est compris entre 100 µm et 300 µm- et GE Healthcare Epoxy-activated Sepharose™.

Avantageusement, dans un procédé selon l'invention, on réalise au moins une étape de stérilisation. On réalise au moins une étape de stérilisation par toute méthode de stérilisation connue pour pouvoir préserver au moins partiellement l'activité de la plasminogénase. Avantageusement et selon l'invention, on réalise au moins une étape de stérilisation par irradiation.

Avantageusement et selon l'invention, on réalise au moins une étape de stérilisation par irradiation à une température prédéterminée. On peut réaliser une telle étape de stérilisation par irradiation à une température inférieure à 0°C. Avantageusement et selon l'invention, on réalise au moins une étape de stérilisation par irradiation à une température supérieure à 0°C.

Avantageusement, dans un procédé selon l'invention, on réalise au moins une étape de stérilisation par irradiations successives, lesdites irradiations successives étant entrecoupées de phase de refroidissement.

Avantageusement et selon l'invention, on réalise au moins une étape de stérilisation de la composition enzymatique. Avantageusement et selon l'invention, on réalise au moins une étape de stérilisation de la composition enzymatique par irradiation.

Avantageusement, on réalise au moins une étape de stérilisation par irradiation libérant une quantité d'énergie comprise entre 5.10^3 J/Kg (5 kGy) et 5.10^4 J/Kg (50 kGy). Avantageusement, on réalise au moins une étape de stérilisation par irradiation avec un rayonnement choisi dans le groupe formé des rayonnements β et des rayonnements γ.

Avantageusement et selon l'invention, on réalise une étape de lyophilisation de la composition enzymatique. On forme une composition enzymatique sous forme de poudre déshydratée.

Avantageusement, dans un procédé selon l'invention, on réalise au moins une étape de stérilisation par irradiation de la composition enzymatique après sa lyophilisation. Un procédé selon l'invention permet d'obtenir une composition enzymatique stérile.

Dans un procédé selon l'invention, on obtient une composition enzymatique stérile et apyrogène.

L'invention s'étend également à une composition enzymatique susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'invention.

L'invention s'étend également à toute utilisation d'une composition enzymatique selon l'invention pour la préparation d'un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine stérile et exempt de composition enzymatique.

L'invention s'étend également à toute utilisation d'une composition enzymatique selon l'invention pour la préparation d'un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine, notamment pour la préparation d'un milieu plasmatique *ex vivo* stérile riche en plasmine.

Avantageusement et selon l'invention, on utilise une composition enzymatique selon l'invention pour convertir au moins une partie du plasminogène d'un milieu plasmatique sanguin en plasmine -qui est la forme active du plasminogène- et former un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine sans libération notable de plasminogénase libre dans le milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine et en limitant les risques d'induction d'une réaction immunitaire chez un patient à qui a été administré le milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine. On obtient alors un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine qui est susceptible d'être utilisé dans le cadre de tout traitement préventif ou curatif d'une pathologie dans lequel une transformation de plasminogénase en plasmine autologue est requise, par exemple dans le cadre du traitement d'une pathologie cardiovasculaire ou dans le cadre d'une intervention chirurgicale, en particulier lors d'une intervention intravitréale d'un traitement -notamment lors d'une intervention chirurgicale- de troubles vitréo-maculaires en ophtalmologie. Un tel milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine peut être obtenu

sous une forme stérile et exempte de support solide et sensiblement exempt d'enzyme, par séparation/filtration sur un filtre de stérilisation.

Avantageusement et selon l'invention, on utilise une composition enzymatique selon l'invention dans un procédé mis en œuvre dans une salle dédiée à la réalisation d'une injection intravitréale (IVT) et dans laquelle une personne habilitée, notamment un chirurgien, un ophtalmologiste, un(e) aide-soignante, procède :

- à un prélèvement de sang du patient, puis ;
- à la préparation -notamment par centrifugation- du milieu plasmatique sanguin, puis ;
- à la mise en contact par mélange dudit milieu plasmatique sanguin et de la composition enzymatique selon l'invention pendant une durée prédéterminée et à une température de l'ordre de 37°C, puis ;
- à une séparation du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine et de la composition enzymatique en vue d'une injection du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine dans le corps d'un patient.

Avantageusement et selon l'invention, on réalise la séparation du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine et de la composition enzymatique par filtration au moyen d'un filtre apte à retenir la composition enzymatique.

Avantageusement et selon l'invention, on réalise la séparation du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine et de la composition enzymatique par filtration au moyen d'un filtre présentant un seuil de coupure de l'ordre de 0,22 µm. Avantageusement, la séparation du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine et de la composition enzymatique est une séparation stérilisante du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine.

On utilise une composition enzymatique selon l'invention lors d'un traitement dans lequel un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine est injecté dans le corps vitré d'un patient aux fins de libérer les contraintes vitréo-maculaires par hydrolyse de fibres protéiques.

On utilise une composition enzymatique selon l'invention pour la préparation d'un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine qui est autologue -c'est-à-dire qui est obtenu à partir d'un milieu plasmatique sanguin issu du sang d'un patient et préparé en vue de son injection à ce seul patient- et qui est dépourvu de protéine hétérologue -c'est-à-dire dépourvu d'une quantité suffisante de protéine hétérologue susceptible d'induire une réaction immunitaire chez le patient-.

Avantageusement et selon l'invention, on utilise la composition enzymatique pour la préparation d'un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine qui est apyrogène. On valide les conditions d'obtention d'un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine apyrogène par la mesure de la température corporelle d'un lapin ayant reçu une injection de milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine obtenu à partir d'une quantité de milieu plasmatique sanguin dudit lapin. L'absence d'augmentation de la température corporelle du lapin suite à l'injection traduit le caractère apyrogène du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine et valide les conditions de son obtention.

Avantageusement et selon l'invention, on utilise la composition enzymatique pour la préparation d'un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine qui est stérile.

L'invention s'étend également à un dispositif pour la préparation d'un milieu plasmatique sanguin *ex vivo* riche en plasmine stérile et exempt de composition enzymatique, comprenant une quantité de composition enzymatique selon l'invention et un filtre présentant un seuil de coupure inférieur ou égal à 0,22 µm.

L'invention s'étend également à un dispositif comprenant :

- un récipient -notamment un récipient hermétiquement clos- contenant la quantité de composition enzymatique ;
- un dispositif d'introduction de milieu plasmatique sanguin dans le récipient ;
- un dispositif de prélèvement hors du récipient d'un milieu plasmatique formé dans le récipient sous l'effet de la composition enzymatique ;

- le dispositif (11) de prélèvement et le filtre étant agencés pour permettre la filtration du milieu plasmatique et l'obtention d'un filtrat constituant un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine stérile exempt de composition enzymatique.

Un dispositif selon l'invention se présente avantageusement sous forme d'un kit, c'est-à-dire d'un nécessaire comprenant plusieurs éléments à l'état séparé, dont au moins :

- le récipient contenant une quantité d'une composition enzymatique stérile selon l'invention, ledit récipient étant hermétiquement clos et adapté pour préserver la stérilité de la composition enzymatique,
- un dispositif d'introduction de la quantité de milieu plasmatique sanguin dans le récipient ;
- un dispositif de prélèvement du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine comprenant la composition enzymatique, et
- le filtre. Avantageusement, le filtre est un filtre de stérilisation du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine et de formation d'un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine stérile et exempt de composition enzymatique.

Dans un premier mode de réalisation d'un dispositif selon l'invention, chacun des éléments constitutifs du kit est emballé séparément stérilement dans un emballage individuel.

Dans un deuxième mode de réalisation d'un dispositif selon l'invention, certains des éléments constitutifs du kit sont emballés stérilement ensembles à l'état stérile dans un emballage commun. Ils peuvent être à l'état monté ou à l'état démonté ou dans un état partiellement monté et à l'état stérile.

Dans un troisième mode de réalisation d'un dispositif selon l'invention, certains des éléments constitutifs du kit à l'exclusion du récipient contenant la composition enzymatique sont emballés ensembles -à l'état assemblé ou à l'état dissocié ou dans un état partiellement assemblé- à l'état non stérile dans un emballage commun puis sont stérilisés par tout procédé de stérilisation connu et adapté.

Le récipient contenant la composition enzymatique peut être stérilisé par tout procédé de stérilisation respectant l'activité enzymatique de l'enzyme immobilisée.

Avantageusement et selon l'invention, le dispositif d'introduction de la quantité de milieu plasmatique sanguin dans le récipient comprend :

- une seringue comprenant un piston coulissant dans un cylindre doté d'une extrémité débouchante de distribution ;
- une aiguille adaptée pour pouvoir être raccordée avec l'extrémité débouchante de la seringue ;

la seringue et l'aiguille étant adaptées pour coopérer et permettre :

- un prélèvement d'une quantité de milieu plasmatique sanguin dans un tube de préparation du milieu plasmatique sanguin, et ;
- une introduction de ladite quantité de milieu plasmatique sanguin dans le récipient.

Avantageusement, le tube de préparation du milieu plasmatique sanguin est également un tube de prélèvement de sang, par exemple sous forme d'un tube Vacutainer® (BD Diagnostics, Le Pont de Claix, France), adapté pour permettre ledit prélèvement et, le cas échéant, pour s'opposer à la coagulation dudit milieu plasmatique sanguin prélevé.

Avantageusement, l'aiguille du dispositif d'introduction présente une longueur adaptée pour permettre le prélèvement du milieu plasmatique sanguin dans le tube de prélèvement et de préparation du milieu plasmatique sanguin.

Avantageusement et selon l'invention, le dispositif de prélèvement comprend :

- une seringue stérile de prélèvement d'une quantité de milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine dans le récipient ;
- le filtre adapté pour pouvoir être inséré entre la seringue stérile et une aiguille de prélèvement dans le récipient du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine comprenant la composition enzymatique, ledit filtre étant apte à recevoir le milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine et la composition enzymatique, à

retenir la composition enzymatique et à délivrer dans la seringue du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine et exempt de composition enzymatique.

Avantageusement et selon un autre mode de réalisation de l'invention, le dispositif peut aussi comprendre une aiguille additionnelle stérile de distribution du milieu plasmatique sanguin riche en plasmine dans le corps d'un patient, dans le cadre du traitement d'une pathologie cardiovasculaire ou dans le cadre d'une intervention chirurgicale, en particulier lors d'une intervention intravitréale d'un traitement -notamment lors d'une intervention chirurgicale- en ophtalmologie.

Avantageusement et selon l'invention, le récipient est un flacon équipé d'un bouchon formé de polymère adapté pour pouvoir être transpercé par une aiguille et permettre une introduction du milieu plasmatique sanguin dans le récipient et un prélèvement du milieu plasmatique sanguin riche en plasmine à partir du récipient.

Avantageusement et selon l'invention, le filtre est un filtre stérilisant présentant un seuil de coupure inférieur ou égal à 0,22 µm, c'est-à-dire sur filtre adapté pour pouvoir retenir des particules dont le diamètre moyen est supérieur à 0,22 µm -notamment des bactéries, des levures, des champignons-.

Avantageusement et selon l'invention, le dispositif comprend une enveloppe externe d'emballage stérile renfermant au moins le récipient stérile comprenant la composition d'enzyme stérile, au moins une seringue stérile, au moins une aiguille stérile et le dispositif stérile de filtration. Avantageusement, l'ensemble formé de la seringue, de l'aiguille, du dispositif de filtration et de l'enveloppe externe d'emballage stérile peut être stérilisé par un traitement de stérilisation (irradiation, oxyde d'éthylène, ou autre…) puis associé avec le récipient stérile comprenant la composition enzymatique.

L'invention concerne également une composition enzymatique, un procédé de préparation, l'utilisation d'une telle composition enzymatique et un dispositif ou kit de traitement d'un milieu plasmatique sanguin, caractérisés en combinaison par tout ou partie des caractéristiques mentionnées ci-dessus ou ci-après.

D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture de la description suivante se référant à la figure unique illustrant un dispositif selon l'invention et aux exemples illustratifs de l'invention donnés à titre indicatif et non limitatif.

Détermination de l'activité plasminogénase (urokinase)

On détermine l'activité enzymatique d'une solution comprenant une plasminogénase (U/mL) par la mesure de la vitesse initiale de la réaction d'hydrolyse à température prédéterminée du substrat S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA•2HCℓ, Chromogenix, Werfen France, Le Pré Saint Gervais, France) introduit dans la solution.

On forme dans une cuve de mesure spectrophotométrique un milieu de mesure à 37°C par mélange d'un volume d'une solution de plasminogénase dans du sérum physiologique et d'un même volume d'une solution aqueuse de S-2251à une concentration de l'ordre de 2 mM (de sorte que la concentration du S-2251 soit de l'ordre de 1 mM dans le milieu de mesure) et susceptible de libérer de la *para*-nitro-aniline ($\varepsilon \approx 10\,000\ M^{-1}.cm^{-1}$) sous l'action de la plasminogénase/urokinase. Á compter du mélange, on mesure -par exemple en continu- l'évolution de l'absorbance (densité optique, DO_{405nm}) à 405 nm du milieu de mesure à 37°C. On évalue la pente à l'origine de la courbe d'évolution de l'absorbance à 405 nm, c'est-à-dire la vitesse initiale Vi de la réaction exprimée en Δ_{abs} / min. L'activité enzymatique (exprimée en U/mL de milieu de mesure) est donnée par la formule (I) ci-après :

$$\text{Activité plasminogénase} = \frac{Vi * Vm * 10^3}{\varepsilon * L * Vs}, \qquad (I)$$

dans laquelle :

- Vi est la vitesse initiale de la réaction exprimée en Δ_{abs} / min ;
- Vm est le volume (en mL) du milieu de mesure ;
- ε est le coefficient d'extinction moléculaire (en $M^{-1}\ cm^{-1}$) de la *para*-nitro-aniline à 405 nm ;

- L est la longueur (en cm) du trajet optique de la cuve de mesure spectrophotométrique, et ;
- Vs est le volume (en mL) de solution de plasminogénase introduite dans la cuve de mesure spectrophotométrique.

Détermination de l'activité plasmine d'un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine

On détermine l'activité enzymatique de la plasmine (dite activité plasmine) d'un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine dépourvu de composition enzymatique et obtenu par mise en contact à 37°C d'une quantité de composition enzymatique selon l'invention avec une quantité de milieu plasmatique sanguin comprenant du plasminogène pendant une durée comprise entre 5 min et 60 min par une mesure spectrophotométrique de la formation de *para*-nitro-aniline à partir de S-2251.

On prépare dans une cuve de mesure spectrophotométrique un milieu de mesure par mélange à 37°C d'un volume du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine et de ce même volume d'une solution aqueuse de S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA•2HCℓ, Chromogenix, Werfen France, Le Pré Saint Gervais, FRANCE) à une concentration de l'ordre de 2 mM (de sorte que la concentration du S-2251 soit de l'ordre de 1 mM dans le milieu de mesure) et susceptible de libérer de la *para*-nitro-aniline sous l'action de la plasmine du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine. Á compter du mélange, on mesure l'évolution de l'absorbance (densité optique, DO_{405nm}) à 405 nm du milieu de mesure à 37°C pendant 5 minutes. On évalue la pente à l'origine de la courbe d'évolution de l'absorbance à 405 nm, c'est-à-dire la vitesse initiale Vi de la réaction exprimée en Δ_{abs} / min. L'activité plasmine du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine (exprimée en U/mL de milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine) est donnée par la formule (II) ci-après :

$$\text{Activité plasmine} = \frac{Vi.Vm.10^3}{\varepsilon.L.Vp} \quad , \qquad \text{(II)}$$

dans laquelle :

- Vi est la vitesse initiale de la réaction exprimée en Δ_{abs} / min ;
- Vm est le volume (en mL) du milieu de mesure ;
- ε est le coefficient d'extinction moléculaire (en M^{-1} cm^{-1}) de la *para*-nitro-aniline à 405 nm ;
- L est la longueur (en cm) du trajet optique de la cuve de mesure spectrophotométrique, et ;
- Vp est le volume (en mL) de milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine introduit dans la cuve de mesure spectrophotométrique.

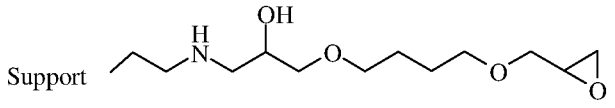
Détermination de la quantité de plasminogénase –notamment d'urokinase- d'un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine

On détermine la quantité de plasminogénase d'un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine par une mesure de fluorescence selon toute méthode connue en elle-même, par exemple par dosage par la technique immuno-enzymatique de type « ELISA » en utilisant un anticorps primaire spécifique de la plasminogénase (notamment un anticorps dirigé contre l'urokinase humaine -par exemple, l'anticorps de lapin ABcam ab24121-) et un anticorps secondaire quantifiable (par exemple, un anticorps de chèvre dirigé contre les IgG de lapin et conjugué à la HRP (« *Horse Raddish Peroxydase* ») en présence d'Amplex®UltraRed. On réalise une courbe d'étalonnage à partir de solutions contenant des quantités connues de plasminogénase dans du milieu plasmatique sanguin.

Préparation d'une composition enzymatique selon l'invention

Dans un procédé de fabrication d'une composition enzymatique selon l'invention, on choisit un support solide à l'état divisé dans le groupe des supports formés d'un matériau hydrophile poreux, notamment dans le groupe des supports formés de particules de matériau hydrophile poreux et présentant des groupements surfaciques de greffage de nature époxydique. Il est possible de choisir le support solide dans le groupe formé du support Epoxy-GE Healthcare (GE Healthcare Epoxy-activated Sepharose™), du support SEPABEADS® EC-EP/S (Resindion, Binasca, Italie).

Il est possible de choisir le support solide à l'état divisé SEPABEADS® EC-HFA/S (Resindion, Binasca, Italie), dont le diamètre moyen des particules est compris entre 100 µm et 300 µm. Les particules du matériau SEPABEADS® EC-HFA/S sont formées de polyméthacrylate et fonctionnalisées en surface par des groupements amino-époxyde de formule (III) ci-après :



(III) ;

à raison d'au moins 75 µmoles de groupement amino-époxyde par gramme de support à l'état sec. La porosité moyenne du support est comprise entre 10 nm et 20 nm.

Dans un procédé selon l'invention, on réalise une immobilisation d'une plasminogénase -par exemple d'une urokinase, ou d'une streptokinase, ou d'une nattokinase, ou d'un activateur tissulaire du plasminogène (t-PA)- sur un matériau solide à l'état divisé. Pour ce faire, on hydrate une quantité de matériau solide sec dans une composition aqueuse d'hydratation. La composition aqueuse d'hydratation peut être par exemple de l'eau osmosée, de l'eau « pour préparation injectable » (dite PPI) ou du sérum physiologique stérile. Par exemple, on place 0,2 g de matériau solide déshydraté à l'état divisé -par exemple 0,2 g de SEPABEADS® EC-HFA/S à l'état sec- dans 40 mL d'eau PPI pendant 1 heure à température ambiante, puis on réalise ensuite trois rinçages successifs du matériau solide hydraté avec 0,7 mL de sérum physiologique stérile à pH 6,8.

On met ensuite le matériau solide rincé en contact avec 0,7 mL d'une solution aqueuse -notamment de sérum physiologique stérile apyrogène ou d'une solution stérile d'irrigation intraoculaire BSS (Bioaqua®, « *Balanced Salt Solution* »)- d'urokinase humaine (U0633, Sigma-Aldrich, Lyon, France) comprenant de l'ordre de 2 unités (2 U/mL) d'activité plasminogénase par mL.

On maintient le contact entre le support solide et l'enzyme pendant plusieurs heures. On prélève le surnageant liquide de réaction, puis on rince 3 fois la composition enzymatique ainsi obtenue avec 0,7 mL d'une solution de NaCℓ 1M dans de l'eau PPI, ou de préférence du sérum physiologique stérile.

Composition enzymatique en conditions « BPF »

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, on réalise la synthèse de la composition enzymatique dans des conditions adaptées pour former une composition enzymatique présentant une teneur en composés pyrogène inférieure à la valeur limite supérieure acceptable pour une composition injectable -notamment inférieure à 0,5 unités d'endotoxine UE / mL-. Selon ce mode de réalisation, le support solide à l'état divisé est un support SEPABEADS® EC-HFA/S obtenu selon un procédé respectant les bonnes pratiques de fabrication (BPF, ou en anglais GMP « *Good manufactoring Practices* ») et présentant une teneur réduite en endotoxines pyrogènes.

Les consommables utilisés, notamment les tubes « falcon », les seringues, les filtres 0.22 µm, les pointes pour micropipette, les tubes sont des consommables certifiés stériles et apyrogènes. La verrerie et le matériel de laboratoire (flacon pour l'hydratation du support, flacons de lyophilisation, bouchons et spatules) sont traités avant utilisation avec une solution de détergent alcalin (E-toxa Clean, 1%) pendant 16h, rincés à l'eau et stérilisés. L'ensemble des manipulations sont réalisées sous hotte à flux laminaire. On choisit des réactifs et solvants de départ qui sont apyrogènes et on réalise les étapes de préparation de la composition enzymatique dans des conditions optimales de stérilité.

On procède à une immobilisation de l'urokinase U0633 sur le support solide à l'état divisé SEPABEADS® EC-HFA/S dans des conditions d'immobilisation « BPF » décrites ci-après. 4,46 g de matériau SEPABEADS® EC-HFA/S (Résindion, production dans des conditions BPF) sont placés pendant une heure à température ambiante dans 893 mL d'eau PPI sous agitation en vue de l'hydratation du matériau. Le support solide est ensuite rincé trois fois avec 15.6 mL de sérum physiologique, puis est mis en contact pendant plusieurs heures avec 15.6 mL d'urokinase (solution d'urokinase U0633 dans du sérum physiologique stérile, stérilisée par filtration sur filtre présentant un seuil de coupure inférieur ou égal à 0,22 µm) à une concentration de 2 U/mL de sérum physiologique stérile de façon à former

la composition enzymatique. On réalise ensuite trois rinçages de la composition enzymatique avec 15.6 mL de sérum physiologique. Le liquide de rinçage est éliminé et des fractions aliquotes de 0,2 g de composition enzymatique humide sont échantillonnées dans des flacons de lyophilisation stériles. Les fractions aliquotes de résine humide sont lyophilisées, puis conservés à 4°C.

Préparation d'un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine

On place 0,7 mL de milieu plasmatique sanguin au contact d'une fraction aliquote de composition enzymatique obtenue ci-dessus à 37°C pendant une durée comprise entre 5 min et 60 min. On sépare par filtration le milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine de la composition enzymatique. On mesure l'activité plasmine (U/mL de milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine) en présence de substrat S-2251, le milieu étant placé à la température de 37°C. On observe une activité enzymatique de l'ordre de 0,2 ± 0,1 U/mL pour un temps de contact du milieu plasmatique sanguin et de la composition enzymatique compris entre 5 min et 60 min, notamment de l'ordre de 15 minutes.

EXEMPLE 1 – Préparation d'une composition enzymatique selon l'invention

On hydrate 0,2 g de matériau SEPABEADS® EC-HFA/S « BPF » dans de l'eau PPI, puis on réalise ensuite trois rinçages successifs du matériau hydraté avec 0,7 mL de sérum physiologique stérile à pH 6,8. On met en contact le matériau ainsi rincé avec 0,7 mL d'une solution de plasminogénase (urokinase U0633) dans du sérum physiologique présentant une activité enzymatique de 2 U/mL. On maintient le contact entre le support et l'enzyme pendant plusieurs heures. On élimine le surnageant liquide de réaction, puis on réalise trois rinçages successifs

La masse d'urokinase présente dans le milieu plasmatique *ex vivo* obtenu par mise en contact de 0,2 g de la composition enzymatique et de 0,7 mL de milieu plasmatique sanguin pendant 60 minutes à la température de 37°C, mesurée par la méthode immuno-enzymatique « ELISA », est comprise entre 2 µg et 20 µg.

EXEMPLE 2 – Effet d'une lyophilisation sur l'activité de la composition enzymatique selon l'invention

On immobilise de l'urokinase sur un support solide à l'état divisé SEPABEADS® EC-HFA/S « BPF » par la méthode décrite à l'exemple 1. On réalise ou non une étape de lyophilisation de la composition enzymatique obtenue. On étudie la capacité de la composition enzymatique lyophilisée ou non en plaçant une même quantité (0,2 g) de composition enzymatique dans 0,7 mL de milieu plasmatique sanguin pendant une durée de 15 min ou 60 min. On sépare par filtration le milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine et la composition enzymatique. On ajoute au milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine à 37°C une solution de substrat S-2251 à une concentration finale de 1 mM dans le milieu de mesure et on mesure l'activité plasmine du milieu plasmatique *ex vivo*. Les résultats sont donnés au tableau 1 ci-après.

Lyophilisation de la composition enzymatique	Activité plasmine à 15 minutes, U/mL	Activité plasmine à 60 minutes, U/mL
non	0,178 - 0,193	0,172 - 0,178
oui	0,174 - 0,196	0,191 - 0,194

Tableau 1

La lyophilisation de la composition enzymatique est sans effet sur son activité de conversion de plasminogène d'un milieu plasmatique sanguin en plasmine.

Stérilisation de la composition enzymatique par irradiation

On réalise une étape d'irradiation à 25 kGy de la composition enzymatique après lyophilisation. On analyse indirectement l'activité de la composition enzymatique irradiée par mesure de l'activité plasmine d'un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine obtenu par mise en contact de ladite composition enzymatique stérilisée et d'un milieu plasmatique sanguin pendant 15 min ou 60 min. On élimine par filtration la composition enzymatique et on mesure l'activité plasmine des milieux plasmatiques *ex vivo* riches en plasmine ainsi obtenus en présence de

S-2251. L'activité plasmine de milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine obtenus après 15 min de contact est comprise entre 0,116 et 0,148 U/mL et l'activité plasmine du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine obtenus après 60 min de contact est comprise entre 0,200 et 0,218 U/mL. .L'irradiation stérilisante de la composition enzymatique permet de conserver une activité plasmine du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine obtenu après 15 min de contact qui est supérieure à 0,1 U/mL et une activité plasmine du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine obtenu après 60 min de contact qui est supérieure à 0,2 U/mL.

Dosage de l'urokinase libre dans le milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine

Le dosage par la technique immuno-enzymatique de type « ELISA » de la quantité d'urokinase présente dans le milieu plasmatique *ex vivo* enrichi en plasmine obtenu par mise en contact d'un milieu plasmatique sanguin et de la composition enzymatique pendant 60 minutes à 37°C est présenté au tableau 2 ci-après.

Composition enzymatique		Urokinase libre, µg
Irradiation, kGy	Lyophilisation	
0	non	10,0 – 13,0
0	oui	7,1 – 9,1
25	oui	4,3 – 7

Tableau 2

La lyophilisation couplée à la stérilisation terminale par irradiation permet de diminuer la quantité d'urokinase libérée par la composition enzymatique dans le milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine.

La quantité d'urokinase libre présente dans le milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine obtenu par mise en contact d'un milieu plasmatique sanguin et d'une composition enzymatique (comprenant une urokinase immobilisée sur un support solide à l'état divisé) soumise à irradiation est inférieure à la quantité d'urokinase présente dans un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine obtenu par

mise en contact d'un milieu plasmatique sanguin et d'une composition enzymatique non soumise à irradiation. La combinaison des traitements par irradiation et lyophilisation de la composition enzymatique permet d'obtenir des quantités d'urokinase dans le milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine qui sont inférieures ou égales à environ 10 µg, en particulier inférieures à 5 µg.

La composition enzymatique selon l'invention permet de convertir un milieu plasmatique sanguin en milieu plasmatique *ex vivo* enrichi en plasmine présentant une activité plasmine élevée. Elle permet de convertir du plasminogène d'un milieu plasmatique sanguin en plasmine sans introduire dans le milieu plasmatique *ex vivo* formé de quantité importante de plasminogénase immunogène.

Préparation d'un milieu plasmatique sanguin et activation

On prélève stérilement une quantité de sang d'un patient à soigner dans un tube de prélèvement (BD Vacutainer®, BD Diagnostics, Le Pont de Claix, France) comprenant un anticoagulant du type EDTA ou citrate de sodium. On réalise une étape de séparation des cellules sanguines et du milieu plasmatique sanguin par centrifugation à 4000 rpm pendant 15 min. On met stérilement le milieu plasmatique sanguin en contact avec la composition enzymatique à la température de 37°C pendant une durée d'au moins 15 min nécessaire pour permettre la conversion de plasminogène en plasmine. On sépare par filtration sur filtre de stérilisation (seuil de coupure de 0,22 µm), par exemple sur filtre Millex PVDF (Millipore) ou sur filtre Acrodisk Syringue Filter, PN4602 (Pall), la composition enzymatique et le milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine exempt d'urokinase libre. On procède ensuite à une injection intraoculaire d'un volume adapté du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine stérile.

Dosage d'urokinase libre dans le milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine

Le dosage par la méthode immuno-enzymatique « ELISA » de la quantité d'urokinase libre présente dans le milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine montre une quantité moyenne d'urokinase libre inférieure à 20 µg.

Un dispositif 20 selon une variante particulière de l'invention représentée sur la figure unique comprend :

- un récipient -par exemple, un récipient 1 en verre- hermétiquement clos et contenant une quantité de composition 2 enzymatique stérile selon l'invention ;
- des moyens 3 d'introduction d'une quantité de milieu plasmatique sanguin stérilement dans le récipient 1 et de mise en contact de ladite quantité de milieu plasmatique sanguin avec la composition 2 enzymatique et comprenant ;
    - une seringue 4 stérile de distribution de la quantité de milieu plasmatique sanguin à partir d'un tube de prélèvement sanguin et d'introduction de ladite quantité de milieu plasmatique sanguin prélevée dans le récipient 1, ladite seringue 4 stérile de distribution comprenant un piston 6 coulissant dans un cylindre 7 doté d'une extrémité, dite extrémité 8 de distribution, axiale débouchante ;
    - une aiguille 5 de distribution adaptée pour pouvoir être raccordée avec l'extrémité 8 de distribution de la seringue 4 stérile de distribution et présentant une extrémité 9 pointue adaptée pour pouvoir être introduite dans le récipient 1 à travers un bouchon 10 transperçable et permettre l'introduction du milieu plasmatique sanguin dans le récipient 1 sous l'effet du déplacement en translation du piston 6 coulissant dans le cylindre 7. L'aiguille 5 de distribution est par exemple de préférence une aiguille de l'ordre de 20 gauge (diamètre extérieur de 0,9081 mm pour une épaisseur de paroi de 0,1524 mm) ;
- des moyens 11 de prélèvement et de filtration d'une quantité de milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine sous l'effet de la composition 2 enzymatique, comprenant ;

- une seringue 12 stérile de préparation d'une quantité de milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine à partir du récipient 1 ;
- un dispositif de filtration 13 doté d'une entrée 14 de milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine, et d'une sortie 15 susceptible d'être raccordée à la seringue 12 stérile de préparation et conformée pour pouvoir délivrer du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine et stérile dans la seringue 12 stérile de préparation, le dispositif de filtration 13 comprenant un filtre 16 apte à retenir la composition enzymatique du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine s'écoulant entre l'entrée 14 et la sortie 15 sous l'effet de la seringue 12 stérile de préparation, ladite entrée 14 étant adaptée pour pouvoir être assemblée et raccordée hermétiquement à une aiguille 17 de prélèvement de milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine du récipient 1 ;
- ladite aiguille 17 de prélèvement étant adaptée pour pouvoir être placée en communication de milieu plasmatique sanguin avec l'entrée 14 du dispositif de filtration 13 et présentant une extrémité 18 pointue adaptée pour pouvoir être introduite dans le récipient 1 et permettre un prélèvement du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine à partir du récipient 1. L'aiguille 17 de prélèvement est par exemple de préférence une aiguille de l'ordre de 20 gauge (diamètre extérieur de 0,9081 mm pour une épaisseur de paroi de 0,1524 mm).

Le bouchon 10 transperçable formé d'un polymère élastique -par exemple, de chlorobutyle- adapté pour pouvoir être transpercé par l'aiguille 5 et permettre l'introduction de milieu plasmatique sanguin dans le récipient 1 et le prélèvement du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine à partir du récipient 1.

Le dispositif de filtration 13 est un dispositif de stérilisation par filtration sur filtre 16 présentant un seuil de coupure de l'ordre de 0,22 µm, c'est-à-dire sur filtre adapté pour pouvoir retenir des particules dont le diamètre moyen est supérieur à 0,22 µm.

Le dispositif 20 comprend une enveloppe 30 externe d'emballage stérile du récipient 1 comprenant la composition d'enzyme, les moyens 3 d'introduction d'une quantité de milieu plasmatique sanguin stérilement dans le récipient 1 et les moyens 11 de prélèvement et de filtration de milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine. L'enveloppe 30 externe d'emballage stérile renfermant les moyens 3 d'introduction d'une quantité de milieu plasmatique sanguin stérilement dans le récipient 1 (comprenant la seringue 4 stérile de distribution et l'aiguille 5 de distribution) et les moyens 11 de prélèvement et de filtration de milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine (comprenant la seringue 12 stérile de préparation, le dispositif de filtration 13 et l'aiguille 17 de prélèvement) peuvent être stérilisés après emballage par tout moyen de stérilisation adapté, le récipient 1 hermétiquement clos et contenant la composition 2 enzymatique stérile selon l'invention étant stérilisé par des moyens de stérilisation respectant la fonctionnalité de la composition 2 enzymatique.

Dans une variante non représentée, le dispositif 20 peut aussi comprendre une aiguille additionnelle stérile d'injection dans le corps d'un patient d'un volume adapté de milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine contenu dans la seringue 12 stérile de préparation de la quantité de milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine. Une telle aiguille d'injection est une aiguille comprise entre 25 et 30 gauge (c'est-à-dire dont le diamètre extérieur est compris entre 0,30 mm et 0,50 mm).

La seringue 12 stérile de préparation de la quantité de milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine peut présenter une extrémité débouchante formée d'un adaptateur de type « Luer-lock » et l'aiguille d'injection peut présenter une extrémité complémentaire de l'adaptateur « Luer-lock » de la seringue 12.

Un dispositif selon une autre variante non représentée de l'invention peut comprendre :

- un récipient 1 hermétiquement clos et contenant une quantité de composition 2 enzymatique stérile selon l'invention ;
- une seringue 12 stérile de préparation d'une quantité de milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine à partir du récipient 1, ladite seringue 12 stérile étant une

seringue de précision apte à pouvoir contenir et délivrer un volume de milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine stérile et exempt de composition enzymatique compris entre 100 µL et 250 µL, et ;

- un dispositif de filtration 13.

L'invention peut faire l'objet de nombreuses variantes sans sortir de la portée de protection. Par exemple les éléments constitutifs d'un dispositif selon l'invention peuvent être à l'état démonté ou à l'état partiellement monté dans l'enveloppe 30 externe.

REVENDICATIONS

1/ - Composition enzymatique comprenant :

- au moins une enzyme, dite plasminogénase, de conversion en plasmine de plasminogène d'un milieu plasmatique sanguin comprenant du plasminogène ;
- un support solide insoluble en solution aqueuse,

le support solide présentant des dimensions adaptées pour pouvoir être retenu sur un filtre présentant un seuil de coupure inférieur ou égal à 0,22 µm ;

caractérisée en ce que ladite plasminogénase est liée au support solide et reste liée à ce support au contact d'un milieu plasmatique sanguin et en ce que la composition est à l'état de poudre déshydratée.

2/ - Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que le support solide est à l'état divisé et formé de particules présentant trois dimensions s'étendant selon trois directions orthogonales entre elles, au moins deux des trois dimensions étant supérieures à 0,22 µm.

3/ - Composition selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que le support solide est formé d'un matériau choisi dans le groupe formé des polymères poly-glucosides et des polymères poly-méthacryliques.

4/ - Composition selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'au moins une plasminogénase est une endopeptidase à sérine de la classe EC 3.4.21 de la classification des enzymes.

5/ - Composition selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'au moins une plasminogénase est liée au support solide par au moins une liaison covalente.

6/ - Composition selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle est stérile.

7/ - Composition selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que chaque plasminogénase est liée au support solide de façon à n'introduire dans un milieu plasmatique sanguin en contact duquel la composition enzymatique est placée qu'une masse de plasminogénase libre inférieure à 400 µg, ledit contact étant réalisé selon le procédé ci-après :

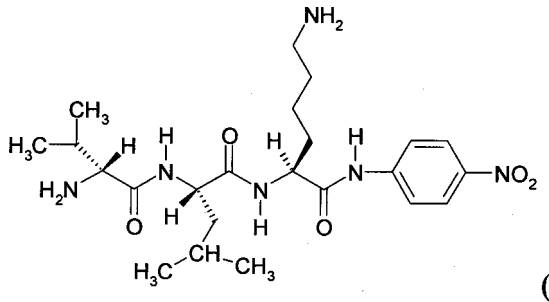
- on mélange à température de l'ordre de 37°C une masse comprise entre 0,01 g et 0,5 g de composition enzymatique à l'état déshydraté avec un volume compris entre 0,5 mL et 1,0 mL de milieu plasmatique sanguin, puis
- on maintient le contact pendant une durée supérieure à 5 min, puis
- on sépare la composition enzymatique et le milieu plasmatique sanguin par filtration sur un filtre présentant un seuil de coupure inférieur ou égal à 0,22 µm, et
- on mesure la masse de plasminogénase libérée dans le milieu plasmatique sanguin.

8/ - Composition selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elle présente une activité, dite activité plasminogénase, de conversion en plasmine de plasminogène d'un milieu plasmatique sanguin au contact duquel elle est placée dans les conditions suivantes :

- on met une masse comprise entre 0,01 g et 0,5 g de composition enzymatique à l'état déshydraté en contact à température de l'ordre de 37°C pendant une durée supérieure à 5 min avec un volume compris entre 0,5 mL et 1,0 mL de milieu plasmatique sanguin, et
- on forme un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine, présentant, après séparation par filtration de la composition enzymatique et du milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine une activité enzymatique initiale, dite activité plasmine, telle que mesurée par un test de libération de *para*-nitro-aniline supérieure à 0,1 µmole de *para*-nitro-aniline libérée par minute et par millilitre (mL) de milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine,

ledit test de libération consistant à :

o mélanger dans le milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine maintenu à la température de 37°C un substrat chromogène S-2251 de formule (I) ci-après :



(I),

à une concentration initiale de l'ordre de 1 mM (c'est-à-dire 10^{-3} mole/L) dans le milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine,

- évaluer la vitesse initiale de libération de *para*-nitro-aniline (en µmole de de *para*-nitro-aniline) par minute et par millilitre (mL) de milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine suite au mélange.

9/ - Procédé de préparation d'une composition enzymatique selon l'une des revendications 1 à 8, dans lequel :

- on choisit au moins une enzyme, dite plasminogénase, de conversion en plasmine de plasminogène d'un milieu plasmatique sanguin comprenant du plasminogène ;
- on choisit un support solide insoluble en solution aqueuse ;
  - adapté pour pouvoir former avec chaque plasminogénase une liaison stable au contact d'un milieu plasmatique sanguin, et ;
  - présentant des dimensions adaptées pour pouvoir être retenu sur un filtre présentant un seuil de coupure inférieur ou égal à 0,22 µm, et ;
- on met en contact le support solide et chaque plasminogénase de façon à lier chaque plasminogénase au support solide, et ;
- on réalise une étape de lyophilisation de façon à former la composition enzymatique.

10/ - Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'on choisit un support solide à l'état divisé et formé de particules présentant trois dimensions s'étendant selon trois directions orthogonales entre elles, au moins deux desdites trois dimensions étant supérieures à 0,22 µm.

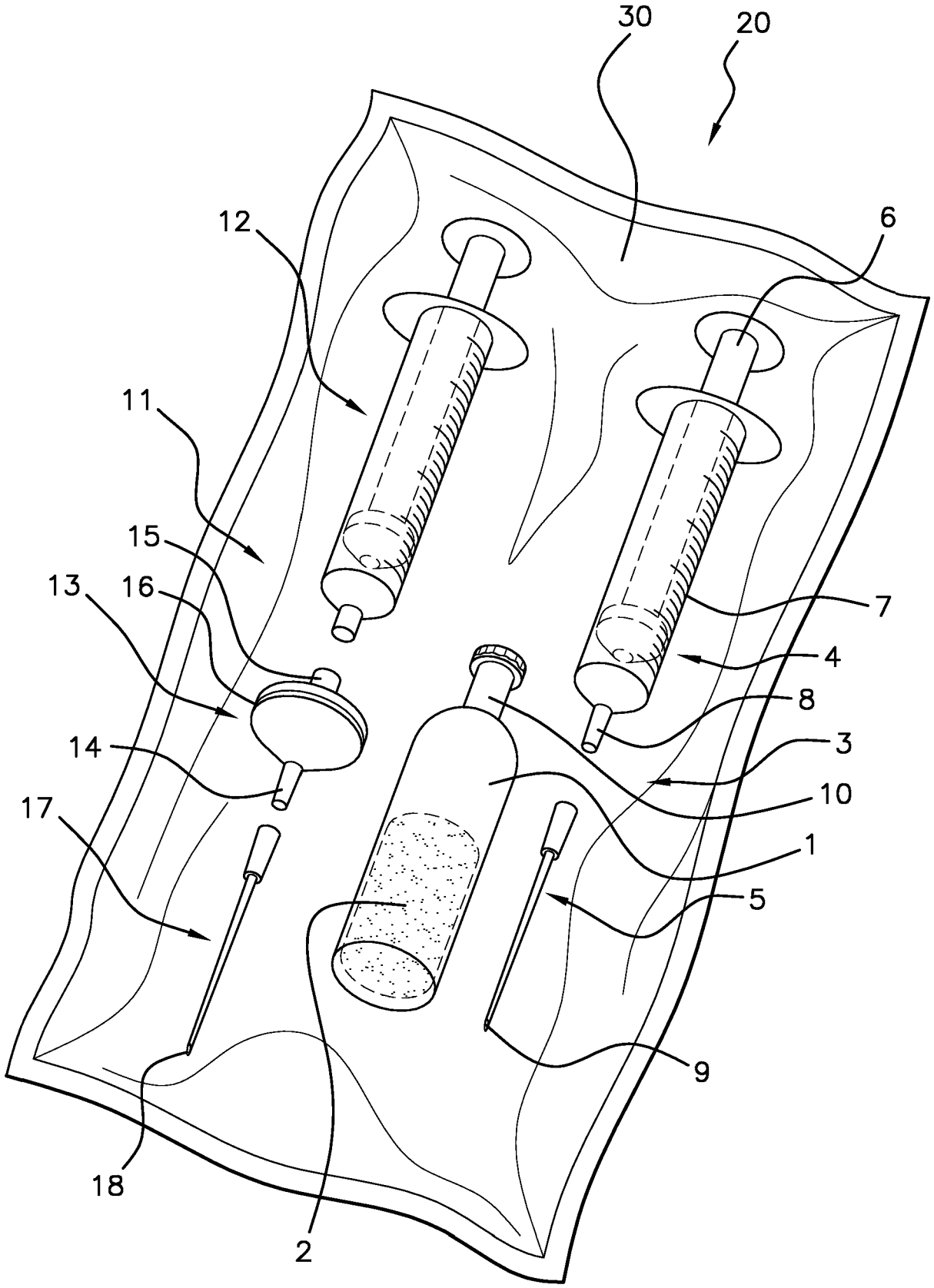
11/ - Procédé selon l'une des revendications 9 ou 10, caractérisé en ce qu'on réalise au moins une étape de stérilisation de la composition enzymatique.

12/ - Utilisation d'une composition enzymatique selon l'une des revendications 1 à 8 pour la préparation d'un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine stérile et exempt de composition enzymatique.

13/ - Dispositif pour la préparation d'un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine stérile et exempt de composition enzymatique, comprenant une quantité de composition enzymatique selon l'une des revendications 1 à 8 et un filtre présentant un seuil de coupure inférieur ou égal à 0,22 μm.

14/ - Dispositif (20) selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il comprend :

- un récipient (1) contenant la quantité de composition enzymatique ;
- un dispositif (3) d'introduction de milieu plasmatique sanguin dans le récipient (1) ;
- un dispositif (11) de prélèvement hors du récipient (1) d'un milieu plasmatique formé dans le récipient sous l'effet de la composition enzymatique ;
- le dispositif (11) de prélèvement et le filtre étant agencés pour permettre la filtration du milieu plasmatique et l'obtention d'un filtrat constituant un milieu plasmatique *ex vivo* riche en plasmine stérile exempt de composition enzymatique.


30
20
12
6
11
15
13
16
7
4
8
14
3
10
17
1
5
9
18
2

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveauté) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.
Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

[x] Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

☐ Le demandeur a maintenu les revendications.

[x] Le demandeur a modifié les revendications.

☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

[x] Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

[x] Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

JP 2007 068497 A (NIHON PHARMACEUTICAL CO LTD) 22 mars 2007 (2007-03-22)

WO 2009/073471 A1 (TALECRIS BIOTHERAPEUTICS INC [US]; NOVOKHATNY VALERY [US]) 11 juin 2009 (2009-06-11)

EP 0 391 400 A2 (GREEN CROSS CORP [JP]) 10 octobre 1990 (1990-10-10)

WO 2010/086531 A1 (ALAXIA [FR]; MARTIN GUILLAUME [FR]; COLLADO MARC [FR]; LENOIR BARBARA) 5 août 2010 (2010-08-05)

FR 2 850 564 A1 (ARCADOPHTA [FR]) 6 août 2004 (2004-08-06)

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

Ge Healthcare: "Instructions 71-5000-15 AF Pre-activated media CNBr-activated Sepharose(TM) 4 Fast Flow Life Sciences", , 2011, XP055239211, Extrait de l'Internet: URL:https://www.gelifesciences.com/gehcls_ images/GELS/Related Content/Files/1314823637792/litdoc71500015 AF_20110831230000.pdf [extrait le 2016-01-07]

3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES

NEANT