

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NE	Niger
BE	Belgique	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NO	Norvège
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IE	Irlande	PL	Pologne
BR	Brésil	IT	Italie	PT	Portugal
BY	Bélarus	JP	Japon	RO	Roumanie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SE	Suède
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	République slovaque
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
CN	Chine	LV	Lettonie	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	MC	Monaco	TG	Togo
CZ	République tchèque	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DE	Allemagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
ES	Espagne			VN	Viet Nam
FI	Finlande				

Procédé de préparation d'une colle biologique
enrichie en facteurs plaquettaires et application.

L'invention a pour objet l'obtention d'une colle biologique contenant des protéines plasmatiques humaines coagulables. La
5 colle biologique obtenue selon l'invention contient notamment des facteurs de croissance d'origine plaquettaire.

On sait que des concentrés de protéines coagulables par la thrombine, ou des solutions de fibrinogène, sont utilisés dans la réalisation d'un matériau collant permettant notamment de
10 réunir les tissus vivants tout en exerçant une action hémostatique ; voir par exemple le brevet FR-2.448.900. Ce matériau collant est couramment appelé "colle biologique" et est utilisé en chirurgie.

Les colles biologiques permettent de reproduire, dans des
15 conditions physiologiques, la phase finale du processus de la coagulation. Pour cela, on mélange extemporanément, sur le tissu vivant à traiter, une solution contenant du fibrinogène et du facteur XIII avec une solution contenant de la thrombine et des ions calcium. Le fibrinogène, en présence de thrombine et d'ions
20 calcium, est transformé en fibrine. Les monomères de fibrine s'assemblent pour former des polymères de fibrine et ces polymères sont réticulés par l'action du facteur XIII activé. Le facteur XIII, activé sous l'action de la thrombine en présence d'ions calcium, est une transamidase qui établit des liaisons
25 peptidiques entre les chaînes de fibrine avec formation d'un réseau.

Dans la présente demande, on appellera "colle biologique" un concentré de protéines coagulables par la thrombine, bien qu'en fait ce soit seulement en présence de thrombine et de sels de
30 calcium (ou après activation de la prothrombine qu'il contient) qu'un tel concentré constitue véritablement une colle.

La formation du réseau de fibrine est responsable de l'activité hémostatique de la colle biologique. Par ailleurs, la fibrine adhère aux tissus environnants, notamment par
35 l'intermédiaire de la fibronectine et du collagène. En outre, le facteur XIII activé établit des liaisons peptidiques entre la

-2-

fibrine et la fibronectine, ce qui renforce les propriétés adhésives.

On sait que le caillot de fibrine disparaît progressivement, in vivo, sous l'action d'une enzyme protéolytique appelée plasmine, ce qui limite la durée du collage. Il est toutefois possible de renforcer la durée d'action des colles biologiques en leur ajoutant par exemple de l'alpha 2-antiplasmine ou un inhibiteur des protéases tel que l'aprotinine, ou encore de l'acide epsilon-aminocaproïque.

Les applications des colles biologiques sont nombreuses, en particulier en chirurgie pour éviter des saignements, pour remplacer les fils de sutures ou pour renforcer celles-ci.

Cependant, les colles biologiques n'ont pas d'activité particulière propre à favoriser la cicatrisation.

On sait que la cicatrisation est favorisée notamment par certains facteurs de croissance agissant directement sur des cellules-cibles présentes au niveau d'une plaie. Ces facteurs de croissance induisent la multiplication ou la différenciation, ou encore l'attraction cellulaire (chimiotactisme). Les plaquettes sanguines (ou thrombocytes) sont une des sources principales de facteurs de croissance dans le sang.

Lors d'une lésion cellulaire in vivo, les thrombocytes libèrent les facteurs de croissance contenus dans des granules, sous l'action d'activateurs des thrombocytes, dont la thrombine. Les surnageants de plaquettes activées renferment une grande diversité de molécules, comme par exemple le facteur de croissance dérivé des plaquettes, ou PDGF (Platelet-derived growth factor), le "Transforming growth factor bêta", le "Basic fibroblast growth factor", le "Platelet factor 4", le "Platelet-derived endothelial growth factor", l'"Heparin-binding epidermal growth factor", le "Insulin-like growth factor 1", le "Connective-tissue activating peptide III", la bêta-thromboglobuline, l'"Epidermal growth factor", le plasminogène, le facteur Von Willebrand, le fibrinogène, la sérotonine, l'histamine, l'adénosine di-et triphosphate, la fibronectine, la vitronectine, le facteur XIII plaquettaire, des enzymes protéolytiques ou glycolytiques, les métabolites de

l'acide arachidonique etc.... ; voir notamment H.L. Wong & S.M. Wahl, In "Peptide Growth Factors and their Receptors" Sporn & Roberts Eds., Springer-Verlag. Berlin, p.510 ;
5 R.A. Terkeltaub & M.H. Ginsberg, In "The Molecular and Cellular Biology of Wound repair", Clark & Henson Eds, Plenum Press, New York, p.38.

Les extraits plaquettaires renferment une activité mitogène élevée, et leur effet cicatrisant est connu ; voir notamment
10 D.Knighton et al., Ann. Surg., 196, 379-388 (1982) ; D.M. Carter et al., In "Growth factors and other aspects in Wound Healing", Barbul. Pines, Cadwell Hunt Eds, Alan R.Liss Inc., New York 1988, p.303-317 ; brevet US 4,760,131 et demandes de brevet PCT WO 86/03122, WO 88/03409 et WO 89/05656.

On a maintenant découvert qu'il est possible d'obtenir une
15 colle biologique améliorée, favorisant notamment la cicatrisation, grâce à un procédé permettant de réunir à la fois les protéines coagulables par la thrombine et des facteurs plaquettaires.

Les modes de préparation des concentrés de protéines
20 coagulables par la thrombine sont connus. La matière première est constituée de plasma sanguin, c'est-à-dire de sang dont on a éliminé les cellules sanguines. Autrement dit, il s'agit d'un produit appauvri en plaquettes. Le procédé consiste essentiellement à précipiter le fibrinogène soit par l'éthanol,
25 selon la méthode de Cohn, soit par l'obtention d'un cryoprécipité. On sait que la préparation d'un cryoprécipité consiste à congeler un plasma puis à le décongeler à une température supérieure à 0 et inférieure à 6°C, généralement comprise entre +1 et +4°C. La fraction solide qui demeure, et
30 qui contient notamment le fibrinogène et la fibronectine, est appelée cryoprécipité et peut être séparée de la fraction liquide par centrifugation. Le volume du cryoprécipité est généralement compris entre 1/25 et 1/100 du volume du plasma de départ. Les protéines plasmatiques insolubles dans les
35 conditions d'obtention du cryoprécipité sont donc concentrées d'un facteur 25 à 100 au cours de la cryoprécipitation. Mais les préparations ainsi obtenues sont pauvres en facteurs de

croissance. En particulier les colles biologiques préparées selon des procédés industriels connus ne renferment pas d'activité mitogène notable.

5 On a maintenant découvert qu'en utilisant comme produit de départ un plasma enrichi en plaquettes, de nombreux facteurs plaquettaires, bien que normalement solubles dans les conditions d'obtention du cryoprécipité, se trouvent retenus dans ledit cryoprécipité en proportions très importantes, alors qu'on devait normalement s'attendre à une répartition uniforme de ces
10 facteurs entre la fraction liquide et le cryoprécipité obtenus.

Le procédé de l'invention permet d'obtenir un produit combinant les propriétés hémostatiques et adhésives des concentrés de protéines coagulables par la thrombine et les activités cicatrisantes des extraits plaquettaires, sans qu'il
15 soit nécessaire de procéder à deux préparations distinctes.

C'est ainsi que grâce au procédé de l'invention, le facteur de concentration du PDGF, dans le cryoprécipité, est généralement supérieur à 10. Le rendement en PDGF est généralement supérieur à 20 ng par milliard de plaquettes
20 présentes dans le plasma de départ.

L'invention a donc pour objet une colle biologique contenant un concentré de protéines coagulables par la thrombine, caractérisée par le fait qu'elle contient au moins un facteur de croissance d'origine plaquettaire.

25 Ledit facteur de croissance est notamment le PDGF.

La colle biologique obtenue selon l'invention contient généralement au moins 20 ng/ml, et le plus souvent au moins 50 ng/ml de PDGF. Généralement, elle peut contenir de 20 à 600 ng/ml de PDGF.

30 La colle biologique selon l'invention contient d'autres produits présents normalement dans les extraits plaquettaires, et en particulier la bêta-thromboglobuline, l'inhibiteur de type 1 de l'activateur du plasminogène (PAI-1) et le facteur XIII plaquettaire (Facteur XIII-A). Elle contient par exemple au
35 moins 10 µg/ml, et en particulier de 10 à 300 µg/ml, de bêta-thromboglobuline, au moins 1 µg/ml de PAI-1 et en particulier de 5 à 40 µg/ml, de PAI-1. La proportion de facteur

XIII-A par rapport au Facteur XIII-S est au moins 1,2 fois plus élevée que la proportion de ces facteurs dans un plasma normal, et en particulier de 1,2 à 4 fois plus élevée.

La colle biologique de l'invention contient par exemple :

- protéines : 60 - 200 g/l,
- fibrinogène : 30 - 150 g/l, en particulier 50-100 g/l,
- fibronectine : 6 - 14 g/l, notamment 8 - 12 g/l,
- facteur XIII : 10 - 60 unités équivalent plasma,
- albumine : 10 - 38 g/l, en particulier 18-30 g/l.

L'unité équivalent plasma correspond à la concentration plasmatique normale en facteur XIII présente dans un pool de plasmas.

La concentration en protéines est déterminée par la méthode du Biuret. La concentration en fibrinogène est déterminée par la méthode pondérale, la concentration en fibronectine et en PAI-1 par un test ELISA (Stago), selon les instructions du fabricant, l'activité en facteur XIII par un test de libération d'amoniac provoquée par l'incorporation d'éthylester de glycine sur un substrat peptidique (Réactifs Berichrom F XIII, Behring), selon les recommandations du fabricant, le facteur XIII-A et XIII-S par la méthode de Laurell en utilisant des antisera spécifiques (Stago). La concentration en albumine est déterminée par électrophorèse sur Acétate de Cellulose (Sebia), selon les recommandations du fabricant. La teneur en protéine de la bande d'électrophorèse caractéristique de l'albumine est déterminée par densitométrie.

La colle biologique de l'invention contient les facteurs de la coagulation en quantité suffisante pour lui conférer la propriété de coaguler en activant soit la voie intrinsèque de la coagulation, soit la voie extrinsèque de la coagulation. La colle biologique contient par exemple entre 0,5 et 1,5 fois la concentration plasmatique normale en prothrombine, déterminée soit par la méthode de Laurell en utilisant un antiserum spécifique (Stago), soit par la méthode chronométrique (Stago déficient II, Stago), selon les recommandations du fabricant.

Une dilution au 1/2 dans un tampon physiologique de la colle biologique présente un temps de Quick équivalent à celui d'un

plasma normal dilué entre 1/2 et 1/6. Le temps de Quick explore la capacité à activer la voie extrinsèque de la coagulation. Il est déterminé à l'aide du réactif de marque "Neoplastine" (Stago), contenant de la thromboplastine, selon les recommandations du fabricant.

Une dilution au 1/2 dans un tampon physiologique de la colle biologique présente un temps de Kaolin équivalent à celui d'un plasma normal dilué entre 1:1 et 1:4. Le temps de Kaolin explore la capacité d'activation de la voie intrinsèque de la coagulation. Il est déterminé à l'aide des réactifs C.K. PREST (Stago), selon les recommandations du fabricant, sauf que la céphaline est omise lors de la réalisation du test.

La colle biologique selon l'invention contient des facteurs plaquettaires en quantité suffisante pour lui conférer des propriétés mitogènes, pouvant être mise en évidence selon les méthodes classiques.

L'activité mitogène de la colle biologique selon l'invention est par exemple telle que diluée au 1/4000e (et même, généralement, au 1/5000e), elle possède une activité mitogène au moins égale à celle d'une solution contenant 0,1 ng/ml de PDGF dans un test de mesure de l'incorporation de thymidine tritiée par des cellules 3T3 stimulées à une phase d'arrêt de croissance.

Un tel test est décrit par exemple par HART C.E. et al., Biochemistry vol.29, 166-172 (1990).

La cellule 3T3 est une cellule d'embryon de souris Swiss (lignée ATCC CCL 92). Une lignée provenant d'un sous-clonage est également disponible (NIH/3T3 ; ATCC CRL 1658).

La colle biologique selon l'invention peut être constituée essentiellement d'un cryoprécipité issu d'un plasma enrichi en plaquettes, et l'invention concerne un procédé de préparation d'une colle biologique dans lequel on prépare et recueille un cryoprécipité à partir d'un plasma congelé, caractérisé par le fait que l'on utilise comme plasma de départ un plasma enrichi en plaquettes.

Autrement dit, le procédé de l'invention est caractérisé par le fait qu'avant de préparer le cryoprécipité, on prépare un

plasma enrichi en plaquettes. L'opération d'enrichissement du plasma en plaquettes est effectuée selon les méthodes usuelles, notamment par centrifugation du sang prélevé.

5 Le plasma enrichi en plaquettes contient généralement au moins 50 millions de plaquettes par ml, notamment de 100 millions à 1 milliard de plaquettes environ par ml, et par exemple de 100 millions à 500 millions environ par ml.

10 Les conditions d'obtention du cryoprécipité sont les conditions classiques. Par exemple on congèle à une température non supérieure à -15°C , par exemple comprise entre -15 et -60°C . On maintient le produit à cette température pendant au moins un temps suffisant pour permettre un équilibre thermique dans la masse du produit. Ce temps est par exemple de l'ordre de 12 heures à 72 heures.

15 Le plasma est ensuite décongelé à une température supérieure à 0°C mais inférieure à la température à laquelle l'ensemble du produit congelé se liquéfie. On opère généralement entre $+1$ et $+6^{\circ}\text{C}$, et en particulier vers $+4^{\circ}\text{C}$. La durée d'incubation à la température de décongélation est suffisante pour permettre de 20 réaliser un équilibre thermique ; cette durée est comprise par exemple entre 12 et 24 heures.

25 On peut ensuite séparer le cryoprécipité de la fraction liquide. Pour cela, on centrifuge le plasma décongelé à une température suffisamment élevée pour ne pas le recongeler, et suffisamment basse pour éviter la liquéfaction du cryoprécipité, puis on élimine le surnageant selon les méthodes connues, et l'on recueille le cryoprécipité qui constitue le culot de centrifugation. Le volume du cryoprécipité représente généralement le 1/25e à 1/100e du volume de plasma initial.

30 Généralement la centrifugation est effectuée à une température comprise entre $+1$ et $+6^{\circ}\text{C}$.

Dans le cas où l'on ne souhaite pas utiliser immédiatement la colle biologique constituée par le cryoprécipité obtenu, on peut la recongeler, par exemple à -20°C .

35 Lorsque la colle biologique est destinée à être utilisée immédiatement, il convient de la liquéfier par chauffage à une température suffisante, habituellement comprise entre 32 et 38°C .

La simplicité du procédé d'obtention de la colle biologique enrichie en facteurs plaquettaires selon l'invention permet d'appliquer ce procédé à la réalisation d'une colle biologique autologue, c'est-à-dire obtenue à partir du plasma provenant
5 d'un seul donneur, en vue de l'utilisation chez ce donneur. L'un des avantages de ce procédé est que toutes les opérations, y compris l'enrichissement du plasma en plaquettes, peuvent être effectuées dans le système de poches utilisé pour le prélèvement
10 du sang d'un donneur.

On peut bien entendu préparer également la colle biologique à partir de plasma provenant de plusieurs donneurs identifiés.

Le produit de départ du procédé de l'invention est un plasma enrichi en plaquettes. La préparation d'un tel plasma enrichi en
15 plaquettes est connue en soi. Elle peut être réalisée par exemple selon la méthode suivante. Du sang total, recueilli lors d'un don de sang, dans un système à poche triple (Maco-pharma par exemple), est centrifugé dans une centrifugeuse Jouan K110 à 3000xg pendant 4 minutes. Le plasma surnageant, riche en
20 plaquettes, est transvasé dans la poche de transfert 3 du système de triple poche, à l'aide d'un extracteur de plasma. La poche 3 est séparée du reste du système par soudure de la tubulure. C'est cette poche qui sera utilisée pour la fabrication selon l'invention du concentré de protéines
25 coagulables par la thrombine.

L'invention a également pour objet l'utilisation de la colle biologique pouvant être obtenue selon le procédé mentionné ci-dessus.

Cette utilisation peut être effectuée selon les méthodes
30 connues en soi. Le principe de cette utilisation consiste à provoquer la formation de fibrine par transformation du fibrinogène. Cette transformation est réalisée par l'action de la thrombine. La thrombine peut être de la thrombine exogène ajoutée, selon les méthodes connues en soi : pour cela, on
35 mélange la colle biologique obtenue telle que décrite précédemment avec une solution aqueuse contenant de la thrombine et des ions calcium afin de déclencher la réaction de coagulation par transformation du fibrinogène en fibrine.

On peut utiliser notamment une solution aqueuse contenant de 0,5 à 500 U NIH/ml de thrombine et une concentration en ions calcium (notamment sous le forme de chlorure de calcium) comprise par exemple entre 5 et 100 mM, en particulier entre
5 20 et 60 mM.

Le mélange avec la solution de thrombine est effectué de préférence in situ, sur les tissus à traiter.

Généralement, on mélange le cryoprécipité liquéfié et la solution aqueuse de thrombine dans des proportions volumiques de
10 5:1 à 1:2.

Si désiré, on ajoute à la colle finale, ou à l'un de ses constituants avant leur mélange, un inhibiteur de plasmine ou analogue (alpha 2-antiplasmine, aprotinine, acide epsilon-aminocaproïque, acide tranexamique par exemple).

On peut aussi tirer avantageusement parti de la présence de prothrombine et d'autres facteurs de coagulation dans la colle biologique de l'invention, et activer soit la voie extrinsèque, soit la voie intrinsèque de la coagulation.

L'invention a donc notamment pour objet l'utilisation de la colle biologique obtenue comme indiqué précédemment, cette utilisation étant caractérisée par le fait que l'on ajoute à ladite colle biologique au moins un agent favorisant l'activation de la prothrombine endogène. On déclenche aussi le phénomène de coagulation, en opérant de préférence à température voisine de 37°C.

Pour cela, il suffit d'ajouter à la colle biologique une solution aqueuse contenant des ions calcium (par exemple 5-100 mM, en particulier 20 - 60 mM).

Si on veut accélérer cette coagulation, on peut opérer comme indiqué ci-après, à l'aide d'activateurs.

Pour activer la voie intrinsèque, on peut mélanger la colle biologique avec une solution aqueuse contenant des ions calcium (par exemple 5 - 100 mM, en particulier 20 - 60 mM), et la mettre en contact avec au moins un activateur connu du Facteur XII de la coagulation, et de manière plus générale avec des surfaces ou des composés solides, par exemple sous forme de poudre, insolubles dans la colle biologique et présentant des
35

charges négatives, comme des silicates, (notamment le Kaolin), la silice, le verre de silice, des cristaux de carbonate de calcium, comme par exemple l'aragonite, provenant par exemple de squelettes de corail, des cristaux de tri-calcium dicitrate. Au
5 bout d'un temps suffisant, qui peut être déterminé par de simples expériences de routine, on sépare la colle biologique desdits composés insolubles par filtration. On peut opérer par exemple dans une colonne munie d'un filtre.

Pour activer la voie extrinsèque de la coagulation, on peut
10 mélanger la colle biologique avec une solution aqueuse contenant des ions calcium 5 - 100 mM (en particulier 20 - 60 mM) et de la thromboplastine tissulaire, par exemple d'origine animale, ou de la thromboplastine produite par génie génétique.

L'un des avantages importants de la colle biologique obtenue
15 selon l'invention est donc qu'elle contient de la prothrombine en quantité suffisante pour permettre de déclencher la coagulation de la colle sans addition de thrombine exogène, ce qui réduit les risques de contamination accidentelle. Le procédé de l'invention est donc particulièrement adapté aux besoins
20 actuels d'utilisation de produits autologues.

La colle biologique selon l'invention peut être utilisée notamment dans le traitement des plaies traumatiques ou chirurgicales, dans la mise en place et le maintien des greffes (notamment greffes de peau, d'os, etc...). Elle peut également
25 être utilisée pour fixer des pièces de prothèse, y compris de prothèses osseuses, de pièces d'ostéosynthèse et de prothèses dentaires, et aussi pour fixer et maintenir assemblés des matériaux de comblement osseux, notamment des matériaux de comblement résorbables à base de carbonate de calcium (par
30 exemple à base de squelette de corail ou de coquille de *Pinctada margaritifera*), d'hydroxyapatite ou de polymères biodégradables comme le poly(acide lactique).

EXEMPLE 1

On a préparé un plasma humain enrichi en plaquettes, comme décrit précédemment.

5 Le plasma enrichi ainsi obtenu contient 154 millions de plaquettes par ml.

La poche de transfert renfermant 230 ml dudit plasma enrichi en plaquettes est placée dans une chambre froide à -40°C pendant 72 heures. La poche de plasma est ensuite placée dans un réfrigérateur à une température de 4°C pendant 20 heures. La
10 poche de plasma est ensuite centrifugée pendant 20 minutes à 3.000 tours par minute, toujours à la température de +4°C. Après centrifugation, la poche est posée horizontalement, une tubulure de prélèvement est mise en place et le surnageant liquide est soutiré par aspiration.

15 Le résidu solide contenu dans la poche constitue le cryoprécipité qui peut être conservé par recongélation à une température de -20°C jusqu'à son utilisation.

Lorsqu'on souhaite utiliser immédiatement le cryoprécipité, on place la poche au bain-marie, par exemple à une température
20 de 37°C. Après 15 minutes d'incubation la solution résiduelle est prélevée. Son volume est de 3 ml environ.

Analyse du produit obtenu : voir tableau 1 ci-après.

25 EXEMPLE 2

On opère de façon analogue à celle décrite à l'exemple 1. Le volume de plasma traité est de 250 ml. Le plasma renfermait au départ, 256 millions de plaquettes par ml. Le volume de la solution finale récupérée, provenant de la liquéfaction du
30 cryoprécipité, est de 5 ml.

Analyse : voir tableau 1.

35 La teneur en PDGF du surnageant obtenu après centrifugation du plasma décongelé n'est que de 5,9 ng/ml.

On voit (par comparaison avec le Tableau I) que la quasi-totalité du PDGF se retrouve dans le cryoprécipité.

TABLEAU I

		Exemple 1	Exemple 2
5	Protéines(1), (mg/ml)	61	89,6
	PDGF(2), (ng/ml)	282	310
	Bêta-Thromboglobuline(3) (μ g/ml)	127	130
10	Coagulable par la thrombine(4)	OUI	OUI
	Activité mitogène(5) (activité spécifique)	104	non-mesuré

- (1) Déterminé par la méthode de Bradford (Réactif Biorad
15 référence 500-0006)
- (2) PDGF : facteur de croissance dérivé de plaquettes (Platelet
Derived Growth Factor), mesuré par un test "ELISA"
- (3) Mesuré par un test "ELISA" (Stago, France, référence 0419)
- (4) Déterminé en mélangeant un volume de cryoprécipité liquéfié
20 à un volume d'une solution de thrombine à 500 U.N.I.H. et de
chlorure de calcium 50 mM. Après 1 minute, on observe la
formation d'un caillot.
- (5) L'activité spécifique est déterminée selon le protocole
décrit ci-après. La radioactivité obtenue avec le témoin est
25 de 2.000 cpm. A 4.000 cpm, la concentration en protéines est
de 0,0096 mg/ml dans l'exemple 1. A titre indicatif,
l'activité spécifique du Tissucol (marque de commerce
désignant une colle biologique vendue par IMMUNO) mesurée
par la même méthode, est de 0,22.

Le protocole de mesure de l'activité mitogène était le suivant:

Des cellules de fibroblastes sont isolées à partir du prépuce d'un enfant âgé de 6 mois.

5 Les cellules sont mises en suspension dans du milieu DMEM (Gibco) renfermant 10% de sérum de veau fœtal. Onensemence chaque puits d'une plaque de microtitration à 96 puits avec 200 μ l de la suspension à 40.000 cellules/ml. Après 3 jours d'incubation à 37°C, en atmosphère à 5% de CO₂, le milieu de culture est remplacé par un milieu DMEM (Gibco) à 8% de sérum de veau nouveau-né.

Après 3 jours d'incubation supplémentaires, 50 μ l d'une solution de protéines coagulables par la thrombine (échantillon) sont ajoutés. Chaque échantillon est testé à différentes dilutions dans du DMEM, et en triple. 50 μ l de DMEM sont inoculés dans des puits témoin. La microplaque est incubée dans les mêmes conditions pendant 24 heures. Six heures avant la fin de l'incubation, 50 μ l d'une solution de thymidine tritiée à 10 μ Ci/ml sont ajoutés dans chaque puits. Après l'incubation, les puits sont lavés par une solution physiologique. Les cellules sont alors décollées du puits par une solution de trypsine à 0,25%, en présence d'éthylène-diamine-tétra-acétate (solution Gibco). Les cellules sont alors récoltées sur un filtre, grâce à un collecteur de cellules de type "Skatron". Les filtres sont alors séchés et la radioactivité est mesurée en présence d'un liquide scintillant.

Détermination de l'activité spécifique :

30 On reporte sur un graphe, en abcisse, la concentration en protéines de l'échantillon dans le puits (exprimée en mg/ml) et en ordonnée la radioactivité correspondante. On détermine graphiquement, par interpolation, la concentration en protéines de l'échantillon donnant un taux de radioactivité double de celle des puits témoin. L'inverse de cette concentration est appelée l'activité spécifique de l'échantillon.

EXEMPLE 3 :

On opère de façon analogue à celle de l'exemple 1. Les résultats des analyses (moyennes de plusieurs expériences) sont consignés dans le tableau II

5

TABLEAU II

	Nb d'exp	Moyenne	Val. mini	Val. maxi
10				
Concentration en plaquettes dans le plasma de départ				
15				
10 ⁶ /ml	15	350	221	552
Protéines g/l	15	120	95	160
Fibrinogène g/l	15	69	52	93
Fibronectine g/l	9	7,8	6	13
Facteur XIII UEP *	15	28	15	57
20				
F XIII-A/F XIII-S	4	2,9	2,14	3,7
PDGF ng/ml	4	400	300	600
bêta-thromboglobuline µg/ml	9	200	184	250
Albumine g/l	6	25,1	19,8	35,9
25				
PAI-1 µg/ml	5	19	14	24

* UEP : Unité équivalent plasma

EXEMPLE 4

30

On prépare une colle biologique de façon analogue à celle décrite dans l'exemple 1. Dans un tube, on mélange successivement 150 µl de colle biologique, 150 µl de serum physiologique, 300 µl d'une solution aqueuse de chlorure de calcium à 25 mM et, soit 300 µl d'une suspension de Kaolin, soit 300 µl d'une suspension de poudre de corail, soit 300 µl de

35

-15-

sérum physiologique. Le tube est incubé à 37°C au bain-marie. On suit l'apparition d'un coagulum dans le tube.

En présence de Kaolin, le coagulum se forme après 4 min d'incubation. En présence de poudre de corail au lieu de Kaolin, 5 le coagulum se forme 7 min. La préparation sans Kaolin ni corail (obtenue par simple addition de sérum physiologique) coagule au bout de 9 min.

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation d'une colle biologique dans lequel on prépare et recueille un cryoprécipité, constituant ladite colle, à partir d'un plasma congelé, caractérisé par le fait que l'on utilise comme plasma de départ un plasma enrichi en plaquettes.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que ledit plasma enrichi contient au moins 50 millions de plaquettes par ml.

3. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que ledit plasma de départ contient de 100 millions à 1 milliard, et en particulier de 100 millions à 500 millions de plaquettes par ml.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé par le fait que l'on réchauffe ledit cryoprécipité pour obtenir ladite colle sous forme liquide.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé par le fait qu'au départ de sang prélevé, on prépare d'abord un plasma enrichi en plaquettes.

6. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que ledit plasma provient d'un seul donneur, et que l'on effectue l'ensemble des opérations dudit procédé dans un système de poches servant à prélever le sang.

7. Utilisation de la colle biologique obtenue selon le procédé de l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée par le fait que l'on ajoute à ladite colle un agent favorisant l'activation de la prothrombine endogène.

8. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée par le fait que ledit agent est une solution aqueuse contenant des ions calcium.

9. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée par le fait que ledit agent est la thromboplastine, en présence d'ions calcium.

10. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée par le fait que ledit agent est un activateur du Facteur XII de la coagulation, en présence d'ions calcium.

5 11. Utilisation selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que ledit activateur est choisi parmi des composés solides insolubles dans la colle biologique et présentant des charges négatives.

10 12. Utilisation selon la revendication précédente, caractérisée par le fait que ledit composé solide est choisi parmi les silicates, le verre de silice, du carbonate de calcium ou du tri-calcium dicitrate.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 93/00954

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 A61L25/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0 068 048 (SERAPHARM) 5 January 1983 see page 12, line 1 - line 21 see page 13, line 27 - line 38 see page 18, line 8 - line 33 ---	1-12
Y	WO,A,86 03122 (CURATECH, INC.) 5 June 1986 cited in the application see page 3, line 1 - line 17; claims ---	1-12
A	WO,A,92 09301 (GREISLER, HOWARD P.) 11 June 1992 see page 10, line 1 - line 6 see page 19, line 7 - line 15; examples 1,9 --- -/--	1-12

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 January 1994

Date of mailing of the international search report

03.02.94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

ESPINOSA, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Patent Application No

PCT/FR 93/00954

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,91 09573 (CRYOLIFE, INC.) 11 July 1991 see page 6, line 2 - line 25 see page 7, line 25 - line 33 see page 9, line 30 - line 31 ---	1-12
A	EP,A,0 305 243 (CENTRE DE TRANSFUSION SANGUINE DE LILLE) 1 March 1989 see the whole document ---	1-12
A	GB,A,2 041 942 (IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT FÜR CHEMISCHE-MEDIZINISCHE PRODUKTE) 17 September 1980 see claims & FR,A,2 448 900 (..IDEM) cited in the application -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 93/00954

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
EP-A-0068048	05-01-83	EP-A, B	0068047	05-01-83
		EP-A-	0068149	05-01-83
		JP-B-	1018054	03-04-89
		JP-A-	58038216	05-03-83
		JP-B-	1018055	03-04-89
		JP-A-	58038217	05-03-83
		JP-A-	58036545	03-03-83
		JP-B-	61039824	05-09-86
		JP-A-	61178927	11-08-86
		US-A-	4427650	24-01-84
		US-A-	4427651	24-01-84
		US-A-	4442655	17-04-84
		WO-A-8603122	05-06-86	AU-B-
AU-A-	5094985			18-06-86
CA-A-	1261259			26-09-89
CH-A-	673774			12-04-90
DE-A-	3586355			20-08-92
DE-T-	3590594			29-01-87
EP-A, B	0202298			26-11-86
EP-A-	0383363			22-08-90
GB-A, B	2248777			22-04-92
JP-T-	62501628			02-07-87
NL-T-	8520384			29-11-84
SE-A-	8603228			25-07-86
US-A-	4957742			18-09-90
US-A-	5178883			12-01-93
US-A-	5165938			24-11-92
WO-A-9209301	11-06-92	AU-A-	9109391	25-06-92
		EP-A-	0564502	13-10-93
WO-A-9109573	11-07-91	US-A-	5030215	09-07-91
		AU-A-	7220691	24-07-91
		EP-A-	0509054	21-10-92
		JP-T-	5504280	08-07-93
EP-A-0305243	01-03-89	FR-A-	2618784	03-02-89
		DE-A-	3869018	16-04-92
		JP-A-	2000114	05-01-90

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 93/00954

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0305243		US-A- 5260420	09-11-93
GB-A-2041942	17-09-80	AT-A- 359652 BE-A- 881466 CA-A- 1128859 CH-A- 649711 DE-A,C 3002934 FR-A,B 2448900 JP-A- 55110556 JP-B- 63040546 NL-A- 8000935 SE-B- 453799 SE-A- 8000469 SE-B- 462613 US-A- 4362567 US-A- 4414976	25-11-80 16-05-80 03-08-82 14-06-85 28-08-80 12-09-80 26-08-80 11-08-88 19-08-80 07-03-88 16-08-80 30-07-90 07-12-82 15-11-83
FR-A-2448900	12-09-80	AT-A- 359652 BE-A- 881466 CA-A- 1128859 CH-A- 649711 DE-A,C 3002934 GB-A,B 2041942 JP-A- 55110556 JP-B- 63040546 NL-A- 8000935 SE-B- 453799 SE-A- 8000469 SE-B- 462613 US-A- 4362567 US-A- 4414976	25-11-80 16-05-80 03-08-82 14-06-85 28-08-80 17-09-80 26-08-80 11-08-88 19-08-80 07-03-88 16-08-80 30-07-90 07-12-82 15-11-83

<p>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 5 A61L25/00</p>		
<p>Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB</p>		
<p>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</p>		
<p>Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 5 A61L</p>		
<p>Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche</p>		
<p>Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)</p>		
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</p>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP,A,0 068 048 (SERAPHARM) 5 Janvier 1983 voir page 12, ligne 1 - ligne 21 voir page 13, ligne 27 - ligne 38 voir page 18, ligne 8 - ligne 33 ---	1-12
Y	WO,A,86 03122 (CURATECH, INC.) 5 Juin 1986 cité dans la demande voir page 3, ligne 1 - ligne 17; revendications ---	1-12
A	WO,A,92 09301 (GREISLER, HOWARD P.) 11 Juin 1992 voir page 10, ligne 1 - ligne 6 voir page 19, ligne 7 - ligne 15; exemples 1,9 --- -/--	1-12
<p><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</p>		
<p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
<p>Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée</p> <p>27 Janvier 1994</p>		<p>Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale</p> <p>03.02.94</p>
<p>Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale</p> <p>Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016</p>		<p>Fonctionnaire autorisé</p> <p>ESPINOSA, M</p>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. Internationale No

PCT/FR 93/00954

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication		
EP-A-0068048	05-01-83	EP-A, B 0068047	05-01-83		
		EP-A- 0068149	05-01-83		
		JP-B- 1018054	03-04-89		
		JP-A- 58038216	05-03-83		
		JP-B- 1018055	03-04-89		
		JP-A- 58038217	05-03-83		
		JP-A- 58036545	03-03-83		
		JP-B- 61039824	05-09-86		
		JP-A- 61178927	11-08-86		
		US-A- 4427650	24-01-84		
		US-A- 4427651	24-01-84		
		US-A- 4442655	17-04-84		
		WO-A-8603122	05-06-86	AU-B- 596954	24-05-90
				AU-A- 5094985	18-06-86
CA-A- 1261259	26-09-89				
CH-A- 673774	12-04-90				
DE-A- 3586355	20-08-92				
DE-T- 3590594	29-01-87				
EP-A, B 0202298	26-11-86				
EP-A- 0383363	22-08-90				
GB-A, B 2248777	22-04-92				
JP-T- 62501628	02-07-87				
NL-T- 8520384	29-11-84				
SE-A- 8603228	25-07-86				
US-A- 4957742	18-09-90				
US-A- 5178883	12-01-93				
US-A- 5165938	24-11-92				
WO-A-9209301	11-06-92			AU-A- 9109391	25-06-92
		EP-A- 0564502	13-10-93		
WO-A-9109573	11-07-91	US-A- 5030215	09-07-91		
		AU-A- 7220691	24-07-91		
		EP-A- 0509054	21-10-92		
		JP-T- 5504280	08-07-93		
EP-A-0305243	01-03-89	FR-A- 2618784	03-02-89		
		DE-A- 3869018	16-04-92		
		JP-A- 2000114	05-01-90		

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO,A,91 09573 (CRYOLIFE, INC.) 11 Juillet 1991 voir page 6, ligne 2 - ligne 25 voir page 7, ligne 25 - ligne 33 voir page 9, ligne 30 - ligne 31 ----	1-12
A	EP,A,0 305 243 (CENTRE DE TRANSFUSION SANGUINE DE LILLE) 1 Mars 1989 voir le document en entier ----	1-12
A	GB,A,2 041 942 (IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT FÜR CHEMISCHE-MEDIZINISCHE PRODUKTE) 17 Septembre 1980 voir revendications & FR,A,2 448 900 (...IDEM) cité dans la demande -----	1-12

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. Internationale No

PCT/FR 93/00954

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0305243		US-A- 5260420	09-11-93

GB-A-2041942	17-09-80	AT-A- 359652	25-11-80
		BE-A- 881466	16-05-80
		CA-A- 1128859	03-08-82
		CH-A- 649711	14-06-85
		DE-A, C 3002934	28-08-80
		FR-A, B 2448900	12-09-80
		JP-A- 55110556	26-08-80
		JP-B- 63040546	11-08-88
		NL-A- 8000935	19-08-80
		SE-B- 453799	07-03-88
		SE-A- 8000469	16-08-80
		SE-B- 462613	30-07-90
		US-A- 4362567	07-12-82
		US-A- 4414976	15-11-83

FR-A-2448900	12-09-80	AT-A- 359652	25-11-80
		BE-A- 881466	16-05-80
		CA-A- 1128859	03-08-82
		CH-A- 649711	14-06-85
		DE-A, C 3002934	28-08-80
		GB-A, B 2041942	17-09-80
		JP-A- 55110556	26-08-80
		JP-B- 63040546	11-08-88
		NL-A- 8000935	19-08-80
		SE-B- 453799	07-03-88
		SE-A- 8000469	16-08-80
		SE-B- 462613	30-07-90
		US-A- 4362567	07-12-82
		US-A- 4414976	15-11-83
