



(22) Date de dépôt/Filing Date: 1992/07/13
(41) Mise à la disp. pub./Open to Public Insp.: 1993/01/19
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2002/11/26
(30) Priorité/Priority: 1991/07/18 (91 09 075) FR

(51) Cl.Int.⁵/Int.Cl.⁵ C12N 9/74, A61K 38/48, C07K 1/16
(72) Inventeurs/Inventors:
MICHALSKI, CATHERINE, FR;
DERNIS, DOMINIQUE, FR
(73) Propriétaire/Owner:
ASSOCIATION POUR L'ESSOR DE LA TRANSFUSION
SANGUINE DANS LA REGION DU NORD, FR
(74) Agent: ROBIC

(54) Titre : PROCEDE DE PREPARATION D'UN CONCENTRE DE THROMBINE HUMAINE DESTINE A UN USAGE
THERAPEUTIQUE

(54) Title: HUMANE THROMBINE CONCENTRATE PREPARATION PROCESS FOR THERAPEUTIC USE

(57) **Abrégé/Abstract:**

Procédé de préparation d'un concentré de thrombine humaine à partir de la fraction PPSB du plasma qui ne comporte aucune addition de facteur d'origine animale pour induire l'activation de la prothrombine en thrombine et qui comprend une étape d'inactivation virale par solvant-détergent et une purification par chromatographie d'échange de cations. Le choix d'un milieu protecteur assure la haute activité spécifique du produit final. Le concentré de thrombine obtenu par ce procédé est destiné à un usage thérapeutique, soit tel quel comme agent hémostatique local, soit en combinaison avec un concentré de fibrinogène pour former de la colle biologique.



Procédé de préparation d'un concentré de thrombine humaine destiné à un usage thérapeutique.

ABREGE DESCRIPTIF

Procédé de préparation d'un concentré de thrombine humaine à partir de la fraction PPSB du plasma qui ne comporte aucune addition de facteur d'origine animale pour induire l'activation de la prothrombine en thrombine et qui comprend une étape d'inactivation virale par solvant-détergent et une purification par chromatographie d'échange de cations. Le choix d'un milieu protecteur assure la haute activité spécifique du produit final.

Le concentré de thrombine obtenu par ce procédé est destiné à un usage thérapeutique, soit tel quel comme agent hémostatique local, soit en combinaison avec un concentré de fibrinogène pour former de la colle biologique.

Pas de dessin.

Procédé de préparation d'un concentré de thrombine humaine destiné à un usage thérapeutique.

5

La présente invention concerne un procédé de préparation d'un concentré de thrombine humaine destiné à un usage thérapeutique, purifié à l'échelle industrielle à partir d'une fraction du plasma humain.

10

La thrombine est une sérine-protéase générée dans le sang circulant par l'activation de son précurseur inactif, la prothrombine. Son rôle est fondamental dans le processus de la coagulation : elle coupe le fibrinogène en monomères de fibrine et elle active, par coupure

15

protéolytique, le Facteur XIII qui stabilise le réseau de fibrine.

20

Elle intervient aussi dans d'autres processus physiologiques : elle initie les réactions de sécrétion et d'agrégation plaquettaire, facilitant ainsi la formation du clou hémostatique. Elle active aussi les protéines du système Complément. Elle a un effet mitogène sur les fibroblastes ce qui accélère la cicatrisation des vaisseaux sanguins lésés.

25

Par ces diverses propriétés, la thrombine trouve des applications thérapeutiques en tant qu'agent hémostatique local. Actuellement, dans ces applications cliniques on utilise de la thrombine animale, équine ou bovine. Ces préparations ne sont pas toujours parfaitement purifiées et leur application peut être à l'origine de réactions immunologiques dues à la surcharge en protéines

30

hétérologues. L'usage de thrombine bovine comporte en outre le risque de transmission de maladies infectieuses récemment diagnostiquées et encore mal maîtrisées comme l'encéphalite bovine spongiforme (ou maladie des vaches folles).

35

La purification de la thrombine, comme celle de nombreuses enzymes, pose des problèmes pour maintenir la totalité de son activité enzymatique. En effet, l' α -thrombine native est généralement instable et, par autolyse

ou par protéolyse limitée, elle donne des dérivés β - et γ -thrombines qui ont perdu une grande partie de leur activité coagulante sur le fibrinogène.

Les techniques de purification connues
5 s'appliquent surtout à la thrombine bovine : elles comprennent la chromatographie sur résines échangeuses d'ions comme la DEAE-cellulose (Yin et al. J. Biol. Chem., 1968, 243, 112) éventuellement associée à une filtration sur Séphadex- G 100 (M) (Baughman et al. J. Biol.Chem.,
10 242, 5252-5259) ; certaines méthodes permettent de séparer les formes β et γ sur colonne de phosphocellulose (Rosenberg et al., J. Biol. Chem. 1970, 245, 5049) et par association de plusieurs chromatographies d'échanges d'ions (Batt et al. J. Biol. Chem. 1970, 245, 4857).

15 De nouvelles résines ont également été utilisées comme le sulphoéthyl ou sulphopropyl Séphadex (Lundblad-Biochemistry, 1971, 10, 2501) ainsi que des chromatographies d'affinité sur des supports comme l'héparine-sépharose (Nordeman et al. Thromb. Res., 1977, 11, 799-888) et p-aminobenzamidine-agarose (Hixson et al. Arch. Biochem.
20 Biophys., 1973, 154, 501).

Deux publications décrivent la purification de thrombine humaine, l'une sur benzamidine-sphérodex (Lorne et al. Rev. Fr. Transf. Hémodiol., 1989, 32, 391-403) mais le
25 produit présente une faible activité (11 à 20 U-NIH/ml), l'autre sur de nouveaux polystyrènes (Fischer et al. J. Chromatography, 1986, 363, 95-100) mais ce produit contient du facteur V bovin (voir plus bas).

Pour obtenir de la thrombine, il faut disposer non
30 seulement d'une source de son précurseur, la prothrombine, mais également, en fonction du mode d'activation choisi, d'une concentration suffisante des autres facteurs de la coagulation impliqués dans le processus d'activation. Différentes méthodes ont été décrites permettant d'activer la
35 prothrombine en thrombine . Fenton et al. (Biochim. Biophys. Acta, 1971, 229, 26-32 et J. Biol. Chem., 1977, 252, 3587-3598) ont décrit la préparation de thrombine à partir de la fraction III de Cohn extraite sur résine, par addition de

chlorure de calcium et de thromboplastine tissulaire extraite de cerveau humain. La réaction peut être accélérée par l'addition de Facteur V d'origine bovine (Bernamon-Djiane-Coagulation, 1968, 1, 259).

On peut aussi utiliser des activateurs spécifiques extraits de venins de serpents (Gosh et al. Thromb. Res., 1980, 20, 281).

10 Ces différentes méthodes présentent toutefois des inconvénients majeurs lorsqu'on envisage la préparation de très grands volumes de thrombine humaine destinée à un usage thérapeutique. Ainsi, la thromboplastine de cerveau humain est difficile à obtenir et constitue un facteur limitant pour traiter plusieurs centaines de litres de plasma. L'activation au venin de vipère est difficilement compatible avec l'usage chez l'homme à moins de disposer d'un système performant permettant son élimination ultérieure. L'utilisation de Facteur V bovin s'est révélée particulièrement dangereuse parce que les quantités résiduelles qu'on peut injecter aux patients sont à l'origine de graves réactions immunologiques.

20 C'est pourquoi la Demanderesse a développé un procédé permettant de préparer de la thrombine humaine purifiée et concentrée, ne comprenant aucune addition de matériel hétérologue et ayant, de plus, subi un traitement d'inactivation virale. Le procédé est simple et compatible avec une application à de grands volumes, à l'échelle industrielle.

30 Le matériel de départ est la fraction PPSB du plasma humain (PPSB : proconvertine ou F VII, prothrombine, facteur de Stuart ou F X et facteur antihémophilique B ou F IX), ainsi, toutes les molécules utiles à l'activation de la prothrombine sont présentes dans le mélange initial : les Facteurs VII, IX, X, les phospholipides et les cofacteurs V et VIII.

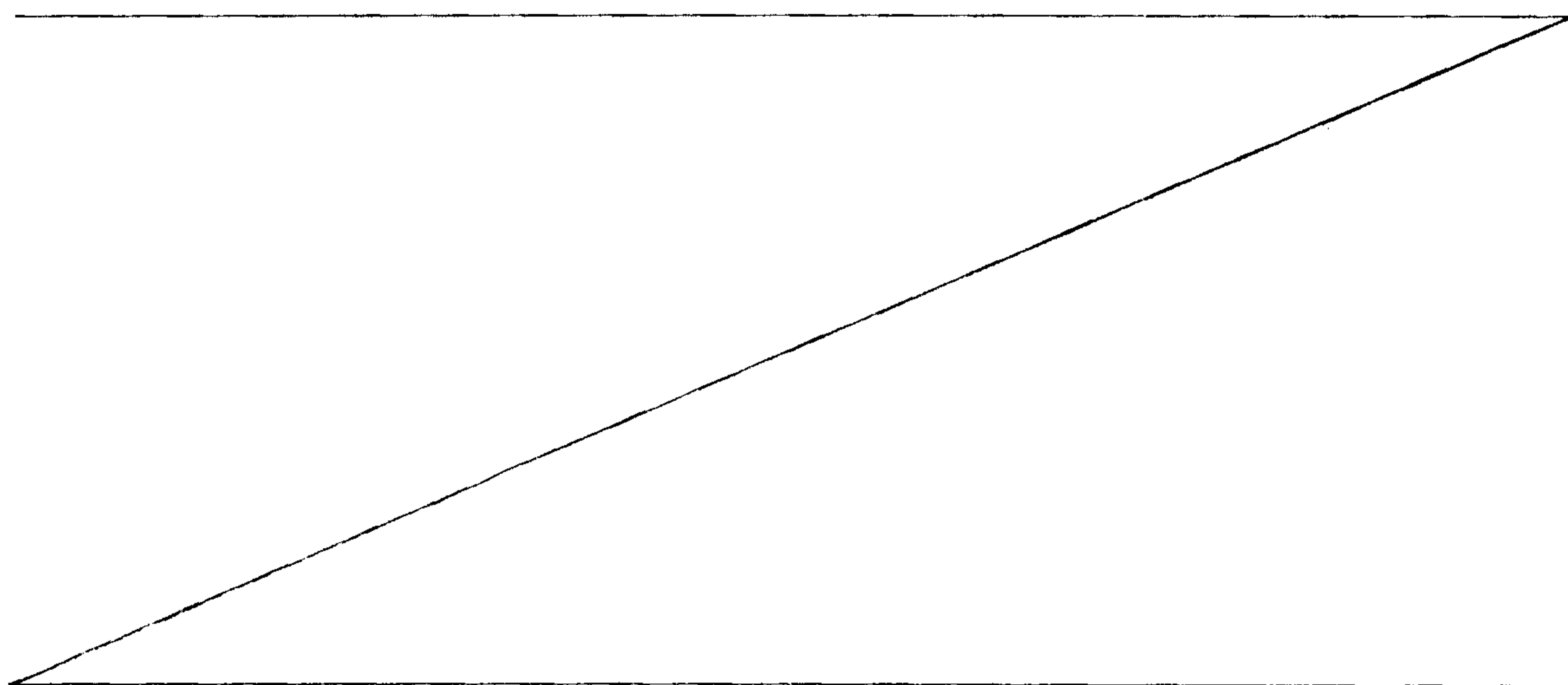
3a

La présente invention concerne donc un procédé de préparation d'un concentré de thrombine humaine à haute activité, à usage thérapeutique, comprenant:

- un traitement préalable d'élimination de fibrinogène et d'inhibiteurs d'activation d'une prothrombine d'une fraction PPSB de départ par lavage au chlorure de sodium;
- une activation de la prothrombine en thrombine de la fraction PPSB préalablement recalciifiée par addition de CaCl_2 à une concentration finale de 5 à 10 mM et est soumis
10 à une première incubation de 2 heures à 37°C et d'une seconde incubation d'au moins 16 heures à 24°C ; et
- une purification de la fraction PPSB activée et recalciifiée par voie chromatographique effectuée sur un gel échangeur fort de cations en présence de gluconate de sodium permettant, après élution, l'obtention d'un concentré de thrombine humaine à haute activité spécifique.

Plus spécifiquement, le procédé mis en oeuvre par le Demanderesse comprend la succession des 6 étapes suivantes:

- 20 a) Le surnageant de plasma cryoprécipité est adsorbé sur DEAE-Sephadex^(M) et lavé en tampon citrate à pH7



contenant du chlorure de sodium de 0,20 M à 0,23 M et de
préférence 0,23 M, ce qui permet d'éliminer le fibrinogène
et les traces d'inhibiteurs qui freineraient la réaction
suivante d'activation de la thrombine. Le PPSB est ensuite
5 élué par augmentation de la concentration de chlorure de
sodium à 0,50 M.

b) L'activation de la prothrombine en thrombine
est amorcée par l'addition de chlorure de calcium à une
concentration finale comprise entre 5 et 10 mM et de
10 préférence de 7mM. (On a observé qu'un excès de CaCl_2
inhibait la réaction d'activation). Cette étape comprend une
première incubation de courte durée suivie d'une seconde,
plus longue et mise en oeuvre à une température inférieure.

Ainsi, le mélange est incubé, dans un premier
15 temps, à 37°C pendant 2 heures. Ce traitement permet déjà la
génération de 300 à 350 U NIH de thrombine par ml de PPSB (U
NIH : unités définies par le National Institute of Health -
USA). On a constaté qu'une incubation plus longue à cette
température n'améliorait pas le résultat.

20 Dans un deuxième temps, l'incubation est
poursuivie à 24°C pendant au moins 16 heures, ce qui permet
d'obtenir de 700 à 1000 U NIH de thrombine/ml de PPSB.

c) Le PPSB ainsi recalifié est soumis, tel quel,
à un traitement d'inactivation virale par solvant-détergent
25 et plus particulièrement par l'addition de TnBP 0,3 %/Tween
1 % ; l'incubation est poursuivie à 24°C pendant au moins 6
heures et, d'une manière générale pendant une nuit. Il faut
noter qu'il est important d'effectuer ce traitement après
l'activation de la thrombine parce que, si on l'effectue
30 avant, c'est-à-dire directement sur le PPSB, on élimine des
facteurs tels que les phospholipides qui sont nécessaires à
la réaction d'activation.

d) La purification de la thrombine est ensuite
effectuée par une seule étape de chromatographie d'échange
35 d'ions, et plus particulièrement sur un échangeur fort de
cations. On utilise préférentiellement un gel rigide
constitué d'une matrice d'agarose substituée par des
groupements $\text{CH}_2\text{-SO}_3$, par exemple la S-Sépharose FF (M)

(Pharmacia). La chromatographie est effectuée en milieu comprenant du gluconate de sodium 40mM et du chlorure de sodium 0,01 M, à pH 6,5. Le gluconate de sodium a un effet protecteur tout à fait favorable sur l'activité biologique de la thrombine.

Après adsorption de la thrombine sur la colonne, celle-ci est lavée en milieu gluconate de sodium 150 mM, NaCl 0,04 M à pH 6,5.

Les conditions d'élution de la thrombine ont été ajustées pour obtenir un pic chromatographique étroit, et plus particulièrement par une augmentation de la concentration de chlorure de sodium à 0,2 M et de gluconate à 150 mM.

L'utilisation d'un milieu à base de gluconate de sodium présente, en outre, l'avantage d'éviter l'étape de dialyse qui est indispensable avec les tampons phosphate classiques.

e) Dès son élution de la colonne de chromatographie, la thrombine en solution dans le tampon gluconate est additionnée d'un mélange de stabilisants comprenant 2 g/l d'albumine, 5 g/l de saccharose et du CaCl₂ 60 mM, le rôle de ces stabilisants étant particulièrement important dans l'étape suivante.

f) La préparation de thrombine est ensuite concentrée, de préférence par ultrafiltration, conditionnée en volumes adaptés à l'utilisation thérapeutique ultérieure et lyophilisée.

La présence d'albumine comme stabilisant s'est révélée indispensable au cours de l'étape de concentration.

On a constaté que le saccharose, de préférence à tous les autres sucres et acides aminés qui ont été essayés, joue un rôle stabilisant très significatif sur le concentré à l'état liquide, au cours de l'étape de conditionnement qui peut être fort longue quand on répartit la solution en volumes de 1 à 5 ml.

La présence de CaCl₂ et de saccharose s'est révélée essentielle comme stabilisant en cours de lyophilisation.

Le procédé selon la présente invention présente plusieurs particularités qui le distinguent nettement des autres procédés décrits (plus particulièrement Lorne et al. et Fischer et al. cités plus haut) et qui procurent au produit final ses avantages remarquables de pureté et de très haute activité spécifique.

En résumé, ces caractéristiques sont :

- l'utilisation d'une fraction PPSB préalablement lavée et débarrassée du fibrinogène et d'inhibiteurs ;
- 10 - le choix des conditions de recalcification : concentration en chlorure de calcium et deux températures successives d'incubation ;
- le traitement d'inactivation virale par solvant-détergent effectué entre les étapes d'activation et de purification de la thrombine et non sur le PPSB, comme cela semblerait 15 souhaitable pour des raisons de sécurité de manipulation, mais qui, à ce stade, dénature les phospholipides qui sont nécessaires à la réaction d'activation de la thrombine ;
- la chromatographie sur un gel échangeur fort de cations et l'utilisation, pour cette étape, d'un milieu protecteur 20 spécifique à base de gluconate de sodium ;
- le choix d'un mélange de stabilisants du produit fini qui protège son activité pendant les 3 dernières manipulations de concentration, distribution et lyophilisation.

25 L'invention a en conséquence pour objet un procédé de préparation d'un concentré de thrombine humaine à usage thérapeutique comprenant une purification par voie chromatographique d'une fraction PPSB du plasma préalablement recalcifié par addition de CaCl_2 comprenant plus 30 particulièrement un traitement de la fraction PPSB de départ pour éliminer le fibrinogène et les inhibiteurs d'activation de la thrombine, par lavage au chlorure de sodium, et, ensuite, une purification par voie chromatographique sur un gel échangeur fort de cations, en présence de gluconate de 35 sodium.

Selon une autre caractéristique de l'invention, le procédé comprend un traitement d'inactivation virale par solvant-détergent qui est effectué après la recalcification

de la fraction de PPSB lavée et avant la purification de la thrombine activée par chromatographie.

Selon une autre caractéristique de l'invention, le procédé comprend l'addition, dans la solution de thrombine éluee de la chromatographie, d'un mélange de stabilisants comprenant de l'albumine, du saccharose et du chlorure de calcium.

Le procédé selon l'invention est particulièrement remarquable parce qu'il s'adapte à de très grands volumes de matériau de départ et, ainsi, permet de produire, en un seul lot, jusqu'à 16 millions d'unités NIH de thrombine (soit 150 fois plus que par d'autres procédés décrits, comme dans la demande de brevet EP-O 378 798) et cela, sans interférer avec la purification des autres dérivés sanguins d'une plus grande importance économique (comme les facteurs de la coagulation sanguine, l'albumine, les immunoglobulines etc.)

L'objet de la présente invention s'étend au concentré de thrombine obtenu par le procédé décrit et qui se caractérise par une activité coagulante au moins égale à 500 U NIH/ml et une activité spécifique au moins égale à 1000 U NIH/mg de protéines.

Sa concentration élevée et son activité spécifique distinguent le concentré selon l'invention d'un autre produit préparé selon un autre procédé (Lorne et al. cité plus haut) et qui n'atteint qu'une activité de 11 à 20 U NIH/ml.

De plus, le concentré selon l'invention étant lyophilisé, son activité coagulante, au cours du temps, est d'une stabilité particulièrement remarquable.

Le concentré de thrombine selon la présente invention est donc parfaitement bien adapté à une application thérapeutique chez l'homme.

Il peut être utilisé tel quel, comme agent hémostatique local.

Il peut également être utilisé pour former de la colle biologique par addition à un concentré de fibrinogène comprenant de faibles quantités de Facteur XIII et de fibronectine, tel que décrit par la Demanderesse dans la

demande de brevet EP-0 305 243. Le mode de formation de la colle biologique reproduit la dernière phase de la coagulation, c'est-à-dire la formation du réseau de fibrine. La thrombine coupe la molécule de fibrinogène en monomères de fibrine. Elle active le facteur XIII en présence des ions calcium, qui vient sous sa forme activée stabiliser la fibrine soluble en un caillot insoluble, ferme et non friable. Le pouvoir hémostatique du produit permet ainsi de limiter les saignements opératoires et postopératoires et de renforcer l'hémostase locale chez les patients présentant un déficit constitutionnel ou acquis de la coagulation (en particulier les malades sous anticoagulant).

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

15

Exemple 1

a) - Préparation de la fraction PPSB.

Le matériel de départ est un surnageant de cryoprécipité de plasma que l'on obtient par décongélation et centrifugation à 0 - 3°C.

1000 à 1500 litres de surnageant sont adsorbés sur DEAE-Sephadex A50^(M) en présence de sérum physiologique, à raison de 1,5 g de résine par litre de surnageant. Après lavage au chlorure de sodium 0,23 M dans un tampon citrate 0,01 M à pH 7, le PPSB est élué par du chlorure de sodium 0,50 M dans le même tampon, concentré à 40 g/l de protéines, et additionné de lysine 2,5 g/l. Il est ensuite ajusté à une osmolarité d'environ 290 mOsm/l à pH 7,0.

Le PPSB ainsi préparé contient, outre la prothrombine à la concentration d'environ 50 U/ml, les facteurs de coagulation X, IX et VII aux concentrations respectives d'environ 45 U/ml, 45 U/ml et 5 U/ml. Il contient également 5 à 6 U/ml des facteurs Vc et VIIc ainsi que des phospholipides dont la présence est mise en évidence par le temps de génération de thrombine (ou TGT 50).

Le lavage par le chlorure de sodium permet d'éliminer le fibrinogène ainsi que certains inhibiteurs

qui, lorsqu'ils sont présents dans le PPSB, freinent la réaction de recalcification.

b) - Conditions de recalcification.

5 9 à 11 litres de PPSB fraîchement préparés ou après décongélation sont filtrés stérilement puis, additionnés de 7 ml de CaCl_2 1M par litre de PPSB, en béccher ou cuve inoxydables stériles de 30 litres et placés au bain-marie à 37°C , pendant 2 heures. Après cette première étape
10 on obtient environ 300 U NIH de thrombine/ml.

La température est ensuite abaissée à 24°C et le mélange est maintenu à cette température pendant encore 16 heures. Le taux de thrombine obtenu en fin de traitement est de 700 à 1000 unités NIH/ml de PPSB.

15 L'activité spécifique de la thrombine, à ce stade, est de 20 à 40 U NIH/mg de protéines.

c) - Inactivation virale.

L'inactivation des contaminants viraux éventuels
20 s'effectue par addition de TnBP à 0,3 % et Tween 80 à 1 % en concentration finale, à la température de 24°C , durant au moins 6 heures. En pratique, le mélange est laissé une nuit supplémentaire en milieu TnBP/Tween 80.

On n'observe pas de perte de l'activité
25 thrombinique pendant cette étape. L'activité spécifique de la thrombine en fin de traitement TnBP/Tween 80 est de 20 à 40 U NIH/mg de protéines.

Le mélange est ensuite congelé à -30°C , en poches de plastique, par aliquotes de 1 à 3 litres.

30

d) - Purification de la thrombine.

Cette étape a pour but de séparer la thrombine du mélange réactionnel contenant le TnBP/Tween 80, les facteurs activés de la coagulation et toutes les autres protéines du
35 PPSB, pouvant être partiellement dégradées par les sérine-protéases.

On effectue une chromatographie sur un gel échangeur fort de cations, la S-Sepharose FF(M) (Pharmacia)

qui est un gel rigide constitué d'une matrice d'agarose substitué par des groupements $\text{CH}_2\text{-SO}_3$.

La thrombine qui est peu stable, est protégée pendant le déroulement de la chromatographie par l'utilisation de gluconate de sodium à pH 6,5, dans les conditions suivantes : après décongélation, 10 à 12 litres de PPSB/thrombine/résidus de solvant-détergent sont ajustés à pH 6,5 puis injectés sur une colonne d'environ 16 litres de S-Sepharose FF(M) équilibrée en milieu constitué de gluconate de sodium 40 mM et de NaCl 0,01 M, à pH 6,5. La majorité des protéines du PPSB ainsi que le TnBP et le Tween 80 ne sont pas retenus par la colonne. Le gel est ensuite soumis à un lavage en milieu gluconate de sodium 150 mM, NaCl 0,04 M, à pH 6,5. La thrombine est ensuite éluée par l'addition de chlorure de sodium 0,20 M dans le même milieu.

Dès son élution de la colonne, la thrombine est recueillie en présence des stabilisants suivants : albumine 2 g/l, saccharose 5 g/l et chlorure de calcium 60 mM. Le produit est ensuite concentré par ultrafiltration, ajusté à une concentration en albumine de 5 g/l et à un pH de 6,3 - 6,5.

Le rendement global de ces 2 étapes, chromatographie et concentration, est de l'ordre de 90 %.

Après filtration stérilisante, le produit est réparti par volumes de 5 ml, 2 ml, 1 ml ou 0,5 ml et lyophilisé, en fonction de son utilisation ultérieure sous forme de colles biologiques. La présence des stabilisants est nécessaire pour maintenir l'activité enzymatique de la thrombine au cours de ces traitements, comme le montrent les tableaux I et II.

TABLEAU I : Stabilité de l'éluat pendant la répartition.

	Trombine U NIH/ml			Activité résiduelle
	To	To + 3 H 30	To + 5 H 30	
Eluat tel quel	429	371	391	91 %
CaCl ₂ 60mM Saccharose 5 g/l	425	384	374	88 %
CaCl ₂ 60 mM Saccharose 5 g/l Albumine 5 g/l	387	384	380	98 %

5 TABLEAU II : Stabilité de la préparation sous forme liquide.

	Thrombine U NIH/ml		
	To	To + 2 semaines	Activité résiduelle
CaCl ₂ Saccharose Albumine	549	535	97 %
CaCl ₂ Saccharose Glycine	557	389	70 %
CaCl ₂ Albumine Glycine	621	518	83 %
CaCl ₂ seul	534	503	94 %

Exemple 2 : - Caractéristiques du produit.

10 Le concentré de thrombine se présente sous forme lyophilisée. Après reconstitution dans l'eau distillée, il est évalué selon les méthodes suivantes :

a) - Activité coagulante.

15 L'activité de l'alpha-thrombine native est mesurée par son activité coagulante sur le fibrinogène. Elle est exprimée en unités NIH (National Institute of Health) par

rapport à une référence standard : thrombine du NIH, lot J.

Après reconstitution en eau distillée, 5 dilutions de 1/300 à 1/900 sont préparées en tampon Owren Koller (L'Hémostase : méthode d'exploration et diagnostic pratique Ed. L'expansion scientifique KJ. CAEN - H.J. LARRIEU. M. SAMAMA.) contenant du polyéthylène-glycol 6000 0,5 %. La mesure du temps de coagulation est effectuée sur appareillage KC 10 Amelung (BAXTER). Dans une série de cupules, on introduit 200 μ l de dilution (standard ou échantillon à tester). Après 1 minute à 37°C, on introduit 200 μ l de fibrinogène à 1 g/l, en déclenchant le chronomètre. Sur papier bilogarithmique, on trace la droite standard. On reporte les temps obtenus pour les échantillons à tester et on déduit leur taux d'U NIH/ml sur le graphique.

15 b) - Activité amidolytique.

L'activité amidolytique de la thrombine est dosée sur le substrat chromothrombine de STAGO selon les indications du fournisseur. Elle est exprimée en nkat/ml. La relation entre les nanokatalas et les unités NIH est 1 U NIH = 2 nkat.

L'activité trouvée sur substrat chromogénique correspond à l'activité de l'alpha-thrombine native ainsi qu'à celle de ses dérivés de protéolyse : β et γ -thrombines.

c) - Taux de protéines.

25 Le taux de protéines est déterminé par la méthode au Biuret.

d) - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Les électrophorèses sont réalisées sur le PHAST SYSTEM^(M) de Pharmacia en Phast gel 10/15 en milieu SDS.

30 e) - Propriétés de la colle biologique formée par la coagulation du concentré de fibrinogène, de Facteur XIII et de fibronectine en présence de thrombine (brevet européen 0 305 243).

35 Les propriétés de la colle biologique formée en présence de thrombine ont été évaluées par les paramètres suivants : vitesse de prise en masse (secondes), pouvoir adhésif sur souris (g/cm²). Le temps de déplacement 50 (secondes) et le déplacement total (radian) ont été

déterminés sur rhéomètre.

Caractéristiques du concentré de thrombine.

Les caractéristiques mesurées selon les méthodes décrites plus haut sont reportées dans le tableau suivant.

TABLEAU III : Caractéristiques des concentrés de thrombine humaine

Numéro de lot	06510010	06510020	06510031	06510032
Volume de reconstitution (ml)	5,2	2,2	1,2	5,2
Thrombine coagulante U NIH/ml	610	540	564	522
Thrombine amidolytique U NIH/ml	688	587	764	739
Taux de protéines g/l	8	7	7	6,5
pH	6,25	6,27	6,30	6,41
Taux de calcium mmole/l	55	56	60	75
Osmolarité mOsm/l	594	539	554	570
Saccharose g/l	2,25	4,8	5,1	4,3
Albumine g/l	6,6	6,4	6,2	6,0
Vitesse de prise en masse (sec)	6	6	5	7
Temps de déplacement 50 (sec)	0,77	0,57	0,81	0,58
Déplacement total (Rad)	0,60	0,36	0,60	0,34
Pouvoir adhésif g/cm ²	130	160	137	142

L'activité coagulante dans le concentré est de l'ordre de 550 U NIH/ml.

L'activité amidolytique est du même ordre 600 - 700 U NIH/ml, démontrant l'absence d'un taux élevé de formes dégradées β et γ -thrombines.

La pureté du produit est évaluée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. En milieu SDS, on met en évidence, outre la bande correspondant à l'albumine de masse moléculaire 67 000, une bande majeure unique correspondant à l' α -thrombine de masse moléculaire 36 000. Après réduction par le β -mercapto-éthanol apparaît une bande correspondant à la chaîne lourde de l' α -thrombine, de masse moléculaire plus faible. La chaîne légère d'environ 4 000 daltons a migré hors de la plaque.

La stabilité du produit après reconstitution a été testée (tableau IV). La thrombine est stable au moins 24 heures à l'état liquide. Elle est également stable sous forme congelée (tableau V) ainsi que sous forme lyophilisée (tableau VI). Cette stabilité est assurée par le milieu gluconate - saccharose - chlorure de calcium - albumine, à pH 6,5.

TABLEAU IV : Stabilité de la thrombine après reconstitution

lot n° :	Activité coagulante (U NIH/ml)	
	0651010 5 ml	06510020 2 ml
To	569	595
To + 3 H	590	614
To + 6 H	596	619
To + 24 H	539	545

TABLEAU V : Stabilité de la thrombine sous forme congelée

lot n° :	Activité coagulante (U NIH/ml)		
	06510020	06510031	06510032
To	610	598	595
T + 1 mois	611	628	582

5

TABLEAU VI : Stabilité de la thrombine sous forme lyophilisée à +4°C

Lot 06510010	Activité coagulante (U NIH/ml)	Vitesse de prise en masse (sec)	Temps de déplace- ment 50 (sec)	Déplace- ment total (rd)	Pouvoir adhésif (g/cm ²)
To	610	6	0,77	0,60	130
To + 1 mois	619	6	0,63	0,44	/
To + 2 mois	609	7	0,62	0,39	155
To + 3 mois	573	5	0,56	0,29	135
To + 12 mois	584	5	0,56	0,30	143

10

La stabilité de la thrombine lyophilisée a également été mesurée dans un test de "vieillissement accéléré" (Tableau VII).

TABLEAU VII : Stabilité de la thrombine sous forme lyophilisée (5 ml) à 45°C.

Lot 06510010	Thrombine coagulante U NIH/ml	Vitesse de prise en masse (sec)	Temps de déplacement 50 (sec)	Déplace- ment total (rd)	Pouvoir adhésif g/cm
To	610	6	0,77	0,60	130
To + 3 semaines	508	6	0,65	0,43	151
To + 6 semaines	520	8	0,83	0,70	152
To + 10 semaines	580	3	0,45	0,20	180
To + 3 mois	555	5	0,71	0,44	-

5

Les propriétés rhéologiques de la colle biologique obtenue en présence de thrombine humaine ou de thrombine bovine ont été comparées, suivant des protocoles de contrôle classiques.

10

L'étude a porté sur le même concentré de fibrinogène utilisé en mélange avec une thrombine bovine ou humaine (06510010). Les protocoles utilisés pour chaque essai sont rigoureusement identiques. Le matériel est un rhéomètre CARRIMED CSL 100 à contrainte imposée.

15

a) - Utilisation en mode fluage.

Mesure de la vitesse de prise

Les temps de déplacement 50, t1 et t2 (temps nécessaire pour obtenir 50 % du déplacement total) sont :

20

t2 (thrombine bovine) : 1.8 s.

t1 (thrombine humaine) : 0.77 s.

Pas de différence significative.

Etude de l'élasticité

25

On note une élasticité instantanée identique pour les deux produits.

b) Utilisation en mode oscillation.

On note un seuil de rupture d'environ 2.500 N/m² pour les deux produits.

Les modules élastiques G' des deux colles
5 présentent une évolution similaire dans le temps.

Le module élastique G' en fonction de la fréquence est comparable pour les deux produits.

Ces résultats confirment les observations faites à l'utilisation du produit en ce qui concerne l'aspect du
10 caillot, l'exsudation et la vitesse de prise en masse.

L'ensemble des résultats permet de conclure que les caractéristiques rhéologiques et les propriétés mécaniques de la colle obtenue en présence de la thrombine humaine sont identiques à celles obtenues en présence de la
15 thrombine bovine qui est le constituant actuel des colles biologiques couramment utilisées.

Exemple 3 : Adaptation du procédé à grande échelle.

20 Le procédé tel que décrit dans l'exemple 1 a été appliqué à plusieurs lots de PPSB compris entre 10 et 15 litres, avec la même efficacité, comme l'indique le tableau VIII.

L'étape ultérieure de chromatographie et
25 concentration s'effectue avec un rendement compris entre 89 et 100 %.

L'ensemble du procédé permet ainsi de produire des lots standardisés contenant plus de 10 millions d'unité NIH de thrombine.

TABLEAU VIII : Activité coagulante de la thrombine après recalcification et inactivation virale

N° de lot	Volume de PPSB traité (en ml)	Total des unités NIH produites, par lot
96510040	10 000	9 276 660
96510050	10 570	9 163 440
96510060	16 310	10 519 950
96510070	15 300	11 979 900
96510080	14 400	14 976 000
96520300	8 155	7 298 725
96520400	13 250	16 761 250
96520500	13 255	10 894 790

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation d'un concentré de thrombine humaine à haute activité, à usage thérapeutique, comprenant:

- un traitement préalable d'élimination de fibrinogène et d'inhibiteurs d'activation d'une prothrombine d'une fraction PPSB de départ par lavage au chlorure de sodium;
- une activation de la prothrombine en thrombine de la fraction PPSB préalablement recalciifiée par addition de CaCl_2 à une concentration finale de 5 à 10 mM et est soumis à une première incubation de 2 heures à 37°C et d'une seconde incubation d'au moins 16 heures à 24°C; et
- une purification de la fraction PPSB activée et recalciifiée par voie chromatographique effectuée sur un gel échangeur fort de cations en présence de gluconate de sodium permettant, après élution, l'obtention d'un concentré de thrombine humaine à haute activité spécifique.

2. Procédé selon la revendication 1 comprenant un traitement d'inactivation virale, caractérisé en ce que ledit traitement est effectué après la recalciification et avant la purification de la thrombine par chromatographie, et en ce qu'il consiste en un traitement par solvant-détergent.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'on stabilise la thrombine éluée du gel de chromatographie par un mélange de stabilisants comprenant de l'albumine, du saccharose et du chlorure de calcium.

4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape de lavage est réalisée avec du chlorure de sodium de 0,20 à 0,23 M dans un tampon citrate sur une colonne de DEAE-Séphadex et qu'elle est suivie de l'élution du PPSB par l'augmentation de la concentration en chlorure de sodium à 0,5 M.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la chromatographie est effectuée sur un gel d'agarose substitué par des groupements $\text{CH}_2\text{-SO}_3$, en milieu comprenant du gluconate de sodium 40 mM et du chlorure de sodium 0,01 M, à pH 6,5.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la thrombine est éluee par une augmentation de la concentration en chlorure de sodium à 0,2 M et en gluconate de sodium à 150 mM.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la thrombine éluee est stabilisée par l'addition d'un mélange comprenant 2 g/l d'albumine, 5 g/l de saccharose et du CaCl_2 60 mM.

8. Procédé selon la revendication 3 ou 7, caractérisé en ce que la solution stabilisée de thrombine est concentrée, distribuée en volumes adaptés à son utilisation thérapeutique ultérieure et lyophilisée.

9. Concentré de thrombine humaine obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il présente une activité coagulante au moins égale à 500 U NIH/ml et une activité spécifique au moins égale à 1000 U NIH/mg de protéines.

10. Agent hémostatique local, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un concentré de thrombine humaine selon la revendication 9.

10 11. Utilisation du concentré de thrombine humaine selon la revendication 9, en combinaison avec un concentré de fibrinogène pour former de la colle biologique à usage thérapeutique.