

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
15 février 2007 (15.02.2007)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2007/017580 A2

(51) Classification internationale des brevets :
A61L 15/32 (2006.01) A61L 31/04 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2006/001880

(22) Date de dépôt international : 2 août 2006 (02.08.2006)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0508392 5 août 2005 (05.08.2005) FR
60/774,607 21 février 2006 (21.02.2006) US

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **KHORIONYX** [FR/FR]; 1 Rue Des Greffières, F-69890 La Tour De Salvagny (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : **TAYOT, Jean Louis** [FR/FR]; C/O KHORIONYX, 1 Rue Des Greffières, F-69890 La Tour De Salvagny (FR).

(74) Mandataires : **COLOMBET, Alain** etc.; Cabinet LAVOIX, 2, Place D'Estienne D'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: IMPLANTABLE PREPARATIONS

(54) Titre : PREPARATIONS IMPLANTABLES

(57) Abstract: An implantable preparation including a material obtainable from globin modified and particularly chemically modified in such a way that it is at least partially soluble at physiological pH, which material is biocompatible and biodegradable in the body. The material is optionally soluble at physiological pH. The preparation can be in the form of a solution, suspension, slurry, gel, film, sponge, powder or granules, or a solid implant, and is particularly useful for wound healing, protecting or filling external skin lesions, smoothing out wrinkles and skin defects, replacing tissues, fixing prostheses or biomaterials, or preventing adhesion.

(57) Abrégé : Préparation implantable, comprenant un matériau susceptible d'être obtenu à partir de globine modifiée, notamment chimiquement pour être, au moins partiellement, soluble à pH physiologique, ledit matériau étant biocompatible, et biodégradable dans l'organisme. Le matériau peut être soluble à pH physiologique, ou bien insoluble à ce pH. La préparation peut se présenter sous forme de solution, suspension, pâte, gel, film, éponge, poudre ou granules, ou implant solide. Application notamment à la cicatrisation, protection ou comblement de plaies cutanées externes, au comblement de rides et défauts cutanés, au comblement de tissus, comme moyen de fixation de prothèses ou biomatériaux, ou moyen de prévention d'adhérences.

WO 2007/017580 A2

Préparations implantables.

La présente invention a pour but de fournir de nouvelles préparations de globine utiles pour une administration à l'homme sous forme d'implants. Ces préparations peuvent se présenter, notamment, sous forme
5 de poudres, pâtes, gels, suspensions, ou solutions injectables, ou de matériaux solides implantables, destinés notamment à corriger des rides, ou à protéger ou combler des plaies et participer à leur cicatrisation. Différents biopolymères ou biomatériaux sont actuellement
10 disponibles pour de telles applications.

On a déjà décrit de nombreuses applications médicales du collagène, que ce soit sous forme de pâtes, par exemple pour le comblement, de formulations fluides ou solides, comme des films ou des compresses, ou sous
15 forme d'implants divers. En fait, seul le collagène animal est généralement utilisé.

La préparation de collagène humain, qui serait préférable au collagène animal pour éviter des réactions immunologiques et inflammatoires, est envisageable à
20 partir de tissus cutanés humains. Mais elle est rendue très difficile car le prélèvement de tissus humains à partir de cadavres pose des problèmes éthiques considérables et nécessite des tests coûteux pour éliminer les risques de transmission de maladies
25 infectieuses, virales ou autres. La préparation de collagène humain à partir de placentas est coûteuse, complexe et difficile à organiser. La préparation de collagène humain par les méthodes modernes de recombinaison génétique ou de cultures cellulaires est
30 aussi très coûteuse, ce qui gênera certainement le développement commercial de ce produit.

La globine insoluble à pH physiologique, non chimiquement modifiée, a récemment été décrite comme alternative au collagène, dans certaines applications

médicales: (brevet FR 2854801). La globine est la protéine constitutive de l'hémoglobine qui, elle même, contient 4 chaînes peptidiques (2 chaînes α et 2 chaînes β) chacune associée à un hème. L'hème est constitué d'une structure tétrapyrrole contenant 1 atome de fer chargé positivement. Il y a 4 hèmes par molécule, responsables de la coloration rouge de l'hémoglobine.

Les procédés de préparation de la globine sont connus depuis très longtemps et ont été développés dans le but d'application alimentaire ou pour la préparation de solutions pharmaceutiques injectables.

Contrairement à l'hémoglobine qui est parfaitement soluble à pH physiologique, la globine est remarquablement insoluble dans les mêmes conditions. Le caractère insoluble, ou difficilement soluble, de la globine dans des conditions physiologiques a gêné jusqu'à présent le développement de ses applications médicales, en tant que substituts plasmatiques. C'est pourquoi la plupart des essais publiés ont cherché à préparer des dérivés solubles de la globine à pH physiologique, notamment par succinylation à l'aide de l'anhydride succinique ou par acétylation à l'aide de l'anhydride acétique, ou par hydrolyse des fonctions amides à pH alcalin. Tous ces procédés augmentent la charge négative de la globine et abaissent son pH isoélectrique, rendant la globine soluble à pH neutre.

Un produit injectable associant une préparation soluble de globine acide avec de l'insuline a été mis au point, breveté et commercialisé : REINER (1939) ; REINER et al.(1939). Il permet après injection, une délivrance progressive de l'insuline à partir de ce complexe : RABINOWITCH et al.(1947) ; BERG et al. (1953). La globine qui compose cette préparation n'est pas chimiquement modifiée ; elle est insoluble à pH physiologique,

présente à faible concentration, et elle n'est pas l'élément actif, ni l'élément principal de ce produit.

Récemment de nouveaux matériaux et de nouvelles applications médicales ont été décrits à partir de
5 globine insoluble à pH neutre dans des conditions physiologiques et ont fait l'objet d'une famille de brevets issus du brevet FR 2854801.

Cependant, il nous a paru intéressant de pouvoir fabriquer des biomatériaux qui soient solubles ou
10 insolubles à volonté, à pH physiologique, en utilisant une même matière première dérivée de la globine.

La présente invention se propose de fournir de nouveaux matériaux et préparations implantables dans l'organisme, préparés à partir de globine modifiée
15 chimiquement pour être soluble à pH physiologique. Ces implants ne présentent pas les inconvénients ou limitations des matériaux et formulations connus, par exemple de collagène, hyaluronate de sodium, ou autres, notamment grâce à la possibilité de les préparer à partir
20 du sang du patient à traiter ou de l'un de ses semblables et à leur caractère naturel et parfaitement toléré.

L'invention a pour objet une préparation implantable, entièrement ou partiellement soluble ou insoluble, pouvant être formulée sous diverses formes,
25 comprenant un matériau susceptible d'être obtenu à partir de globine modifiée, notamment chimiquement pour être, au moins partiellement, et de préférence entièrement soluble à pH physiologique, ledit matériau étant biocompatible, de préférence stérile, et biodégradable. Par pH
30 physiologique on entend notamment un pH compris entre 6 et 8, préférentiellement entre 6,5 et 7,5 et préférentiellement la gamme des pH physiologiques. Par implantable, on entend la faculté d'être implanté dans l'organisme, dans des tissus ou en contact avec eux, y

compris sur la peau ou sur des plaies externes, l'administration intra-vasculaire étant exclue.

Ladite globine modifiée est de préférence modifiée pour être complètement soluble à pH physiologique, mais
5 elle peut aussi n'être modifiée, par exemple à partir de la globine insoluble provenant de l'hémoglobine, que d'une façon plus limitée, mais la rendant nettement hydrophile et soluble partiellement.

Les préparations implantables selon l'invention
10 sont, de préférence, totalement stériles, mais peuvent également ne pas l'être, notamment lorsqu'elles proviennent de prélèvements biologiques autologues du patient lui même. Ces questions de stérilité font partie des connaissances ordinaires de l'implantologue
15 spécialisé, notamment lorsqu'il s'agit du soin d'une plaie chronique cutanée.

La stérilisation peut être obtenue notamment par irradiation beta ou gamma, par exemple sous forme congelée en présence de carboglace, ou par autoclavage,
20 notamment à 120°C.

Dans un mode de mise en œuvre, le matériau susceptible d'être obtenu à partir de globine modifiée pour être soluble à pH physiologique, est cette globine modifiée elle-même.

25 Dans un autre mode de mise en œuvre ce matériau peut être obtenu en insolubilisant ladite globine modifiée soluble à pH physiologique.

Ces préparations solubles ou insolubles sont notamment sous forme de pâte ou gel injectable pour
30 l'implantation, de matériaux solides implantables, par exemple de poudre, de granules, ou de films. Elles peuvent être solubles dans un liquide physiologique ou rendues insolubles après réticulation chimique de la globine soluble. Par injectable, on entend la propriété

de pouvoir être injecté pour réaliser l'implantation locale, à l'exclusion de toute injection intraveineuse ou intraartérielle qui sont formellement contre-indiquées.

De préférence, pour être rendue soluble à pH physiologique, la globine est modifiée chimiquement par traitement alcalin, notamment à la soude, et/ou par estérification des fonctions carboxyliques, et/ou acétylation ou succinylation, auxquelles sont sensibles ses fonctions amines. De plus ladite globine peut être rendue partiellement soluble, par une réaction chimique partielle ou une incubation alcaline plus courte, ou à une concentration inférieure à 1N. A titre d'exemples, des traitements en soude NaOH de concentration 0,1 à 1N pendant 4 à 24 heures, à température ambiante sont possibles. Lorsque la concentration de soude, ou d'une autre base alcaline, est augmentée le temps d'incubation ou/et la température peuvent être diminués.

Dans une forme de réalisation, ledit matériau est sensiblement soluble à pH physiologique, et dans ce cas, de préférence, ledit matériau est ou comporte ladite globine modifiée pour être soluble à pH physiologique.

Dans une autre forme de réalisation, au contraire, ledit matériau est sensiblement insoluble à pH physiologique, de préférence en étant obtenu par réticulation de ladite globine soluble à pH physiologique.

Dans une autre forme de réalisation, la préparation comporte, à la fois, un desdits matériaux soluble à pH physiologique et un desdits matériaux insoluble à pH physiologique.

Dans d'autres formes de réalisation, la préparation peut comprendre un autre matériau, notamment de comblement, biocompatible, stérile et insoluble à pH physiologique, notamment de la globine biodégradable,

par exemple stérile, et insoluble à pH physiologique telle que définie dans FR-A-2 854 801.

Ledit autre matériau peut aussi être choisi dans le groupe constitué par les celluloses oxydées, les
5 collagènes et le chitosan, ou généralement les matériaux de comblement ou augmentation tissulaire.

La préparation peut se présenter sous forme de suspension, pâte, ou gel, de préférence suffisamment fluide pour être injectable.

10 Mais dans d'autres formes de réalisation elle peut se présenter sous forme solide, par exemple sous les formes suivantes:

- poudre ou granules,
- film, membrane ou treillis,
- 15 - éponge,
- implant solide préformé.

Elle peut également se présenter sous forme d'une solution injectable, et dans ce cas, si ladite globine modifiée pour être soluble à pH physiologique est
20 présente et forme le constituant actif principal, on préfère que la concentration en ladite globine soit au moins de 10%, de préférence supérieure ou égale à 12% ou 15%.

La préparation peut comprendre une poudre de globine
25 modifiée pour être soluble à pH physiologique, Elle peut alors comporter, de plus, un agent réticulant, le mélange pouvant former une colle adhésive sur les tissus organiques. Ledit agent réticulant peut être lui-même sous forme de poudre, l'ensemble pouvant former une colle
30 en présence d'un milieu liquide, notamment liquide physiologique.

Une préparation comprenant ladite globine modifiée pour être soluble à pH physiologique peut comprendre également un matériau solide insoluble à pH

physiologique obtenu à partir de ladite globine et/ou un autre matériau solide, à savoir de la globine biodégradable, stérile et insoluble à pH physiologique.

Cet autre matériau peut être sous forme de poudre.

5 Ces préparations comprenant ladite poudre de globine modifiée pour être soluble à pH physiologique, peuvent être formulées sous forme de spray ou aérosol sec, ou bien ladite globine modifiée peut être associée à un pansement solide.

10 De préférence une préparation injectable comporte de la globine modifiée pour être soluble à pH physiologique.

Mais une préparation comportant de la globine modifiée pour être soluble à pH physiologique peut aussi
15 être réalisée sous forme de tissu, de tricot, de treillis, d'éponge, ou de film implantables, optionnellement renforcés par un matériau implantable suturable.

Elle peut comprendre un autre matériau solide
20 biocompatible, notamment de la cellulose oxydée, du collagène ou du chitosan, ou bien un matériau solide insoluble à pH physiologique obtenu à partir de ladite globine ou encore de la globine biodégradable, de préférence stérile, et insoluble à pH physiologique
25 selon FR-A-2 854 801.

Si le matériau est insoluble à pH physiologique, ladite préparation peut aussi être formulée sous forme de poudre, par exemple sous forme de spray ou aérosol sec.

Une préparation comprenant un matériau insoluble à
30 pH physiologique obtenu à partir de globine modifiée pour être soluble à pH physiologique peut être réalisée sous forme de film, optionnellement renforcé par un matériau suturable, ou d'implant solide obtenu, par exemple, par réticulation d'un gel ou d'une mousse de globine modifiée

pour être soluble à pH physiologique.

Dans une autre forme de réalisation une préparation comprenant un matériau insoluble à pH physiologique obtenu à partir de globine modifiée pour être soluble à pH
5 physiologique peut comporter un agent fluidifiant et se présenter sous forme de suspension, pâte ou gel. L'agent fluidifiant peut être de l'acide hyaluronique (ce qui sous entend aussi ses équivalents, hyaluronates), de la carboxy méthylcellulose ou de la gélatine.

10 De façon avantageuse ledit agent fluidifiant peut être de la globine modifiée pour être soluble à pH physiologique.

Une préparation liquide comprenant une solution de globine modifiée pour être soluble à pH physiologique,
15 peut être réalisée sous forme de spray ou aérosol liquide, ou bien en solution associée à un pansement.

De telles préparations dans lesquelles ladite globine modifiée pour être soluble à pH physiologique est en solution peuvent comporter un agent réticulant, pour
20 former une colle adhésive sur les tissus organiques.

Elles peuvent aussi se présenter sous forme de mousse et comporter un agent réticulant pour former une colle adhésive sur les tissus organiques.

D'une façon générale, les colles biologiques selon
25 l'invention peuvent aussi contenir un agent adhésif, notamment l'acide hyaluronique ou la carboxy méthylcellulose.

Les préparations comprenant de la globine modifiée pour être soluble à pH physiologique peuvent comprendre,
30 de plus un matériau solide et se présenter sous forme d'éponge, de treillis, tissu, tricot, ou film, optionnellement renforcés par un matériau suturable, cet autre matériau étant, de préférence, choisi dans le groupe des textiles formés de fils fabriqués à partir de

polymères résorbables ou non résorbables tels que les polyesters, les polyalcènes, les familles des polyhydroxyacides, celluloses oxydées, collagènes et chitosan. Ledit autre matériau peut aussi être obtenu à
5 partir de globine modifiée pour être soluble à pH physiologique et rendu insoluble à pH physiologique, ou bien encore comprendre de la globine biodégradable, et insoluble à pH physiologique.

De façon avantageuse les préparations adhésives
10 formant une colle biologique peuvent se présenter sous forme d'un kit comprenant, dans des réservoirs distincts, le matériau soluble à pH physiologique et l'agent réticulant.

Les préparations selon l'invention peuvent se
15 présenter sous une forme d'un seul tenant, de préférence prêtes à l'emploi. Cependant elles peuvent aussi se présenter sous forme de deux ou plusieurs composants destinés à être associés ou mélangés, par exemple sous forme de kit, de préférence sous forme stérile. Par
20 exemple, des réservoirs ou seringues distincts peuvent contenir le matériau obtenu à partir de globine modifiée et un autre composant, par exemple agent fluidifiant ou de viscosité, agent réticulant ou agent adhésif.

L'intérêt de cette nouvelle famille de produits
25 réside notamment dans le fait qu'il s'agit de biomatériaux protéiques solubles ou insolubles à volonté, préparés à partir d'une protéine définie, pure et homologue, parfaitement biocompatible avec les tissus environnants dans lesquels ils sont injectés. Cette
30 protéine, lorsqu'elle est d'origine naturelle, doit subir avant d'être utilisée une modification chimique pour la rendre soluble à pH physiologique.

Les applications médicales permises par ces biomatériaux préparés à partir de globine modifiée

chimiquement sont nombreuses. De plus, ces applications sont inattendues, car à ce jour, aucun produit dérivé de la globine n'est commercialisé sous forme de biomatériau implantable pour des applications médicales ou chirurgicales. Ce caractère inattendu est d'autant plus surprenant que la globine représente environ 75% de toutes les protéines du sang (Globules + plasma) et que seules les protéines plasmatiques, représentant les 25% restant, sont utilisées aujourd'hui en médecine. Parmi elles, l'albumine, ou le fibrinogène sont utilisés pour des applications médicales et chirurgicales diverses telles que : solutions colloïdales injectables, revêtements, adhésifs, etc... Il est alors possible par exemple d'associer de manière nouvelle les colles à base de fibrinogène plasmatique, dites colles de fibrine, telles que Tisseel®, Tissucol®, Quixil®, Hemaseal®, Beriplast® et d'autres avec les matériaux de globine adhésifs ou non adhésifs. Cette opportunité permet une utilisation rationnelle des protéines sanguines qui peut contribuer à éviter leur gaspillage, diminuer les doses nécessaires, améliorer leurs performances et augmenter le nombre de leurs applications. Ces colles chirurgicales selon l'invention comportent donc une teneur en matériau à base de fibrinogène, de préférence inférieure à la teneur habituelle, et un matériau soluble ou non pouvant être obtenu à partir de la globine modifiée, conformément à l'invention, ou bien encore de la globine insoluble non modifiée.

Dans de nombreuses applications de l'invention le matériau obtenu à partir de la susdite globine modifiée joue le rôle d'un constituant actif, voire d'un constituant actif principal ou exclusif, par son interaction physiologique, notamment au niveau

cellulaire, avec le tissu dans ou sur lequel il est implanté.

La globine humaine homologue peut être préférable à une globine animale hétérologue et permet alors d'éviter
5 au mieux toute réaction immunologique du patient à traiter, pendant ou après l'implantation. Ce produit représente donc un avantage important par rapport au collagène qui jusqu'à présent est préparé à partir de
10 peaux d'animaux (veau, porc, etc...) et qui nécessite un certain nombre de précautions et conditions pour éviter les réactions immunologiques chez les patients :
Nécessité de tester chaque patient pour une éventuelle allergie au collagène animal et impossibilité de traiter les personnes allergiques.

15 La globine chimiquement modifiée, soluble à pH physiologique peut être filtrée stérilement sur des membranes poreuses. Pour des concentrations appropriées de 1 à 50% (10 à 500 mg/ml), de telles solutions peuvent
20 être traitées comme des solutions de protéines et permettent de réaliser des produits tels que : éponges, films, granules, poudres, solides divers, en utilisant ou combinant les techniques de séchage, lyophilisation, réticulation, précipitation. Quelques exemples sont développés ci-dessous.

25 La globine est facile à purifier à partir de globules rouges provenant de sang animal ou humain. Les globules rouges humains sont disponibles en quantité importante à partir des dons périmés restant en stock dans les centres de transfusion sanguine et pour lesquels
30 tous les tests préalables sanitaires ont été réalisés au moment du prélèvement. La préparation de globine soluble à pH physiologique et implantable, ou d'autres biomatériaux insolubles à base de la même globine chimiquement modifiée puis réticulée, représentent donc

une voie nouvelle pour satisfaire des applications biomédicales qui se développent de plus en plus, tout en permettant de valoriser le sang non utilisé ou les dons de sang périmés et d'éviter ou de diminuer leur destruction. En contraste avec d'autres protéines, dont les collagènes, la globine chimiquement modifiée et soluble à pH physiologique présente l'originalité de conserver son caractère soluble malgré un traitement alcalin prolongé ou/et malgré une stérilisation par irradiation. Ceci facilite son emploi en toute sécurité, grâce à la garantie d'une puissante inactivation des agents infectieux ou transmissibles potentiellement présents dans tout produit d'origine biologique. Ceci permet d'exploiter en médecine humaine, les propriétés biologiques de la globine, lorsqu'il est nécessaire d'utiliser une préparation soluble à pH physiologique.

La mise en œuvre de l'invention est possible aussi à partir d'un prélèvement d'échantillon de sang du patient à traiter d'environ 20 à 200 ml, et sa transformation en globine autologue, chimiquement modifiée, avec les mêmes méthodes que pour de grands volumes, puis sa transformation en biomatériau implantable destiné à des applications telles que la protection, le comblement ou la cicatrisation des plaies chroniques, ou la correction ou le comblement des rides. Le nombre d'unités préparées à partir d'un prélèvement du patient peut être important et permettre un traitement répétitif et prolongé du patient. Pour l'étape d'hémolyse des globules rouges, ceux-ci peuvent être préalablement purifiés, pour partir d'une solution d'hémoglobine purifiée, déjà séparée des protéines plasmatiques. Mais cette étape peut être supprimée, notamment grâce à la propriété spécifique d'insolubilité de la globine dans une solution aqueuse de

pH neutre, qui la distingue des autres protéines plasmatiques et permet de la séparer.

De même le placenta humain qui est expulsé après l'accouchement contient du sang qui est généralement
5 détruit par incinération, mais qui peut servir aussi à l'invention.

Les poches de sang de donneurs sont contrôlées officiellement par les organismes de transfusion sanguine, grâce aux nombreux examens biochimiques,
10 bactériologiques, sérologiques et tests de screening des différents virus et d'autres agents infectieux. Dans le cas du sang placentaire, il serait évidemment nécessaire de réaliser les mêmes examens sur des échantillons de sang du cordon ombilical ou de la mère avant de pouvoir
15 collecter, conserver et extraire le sang de cette matière première. Pour le sang autologue, les tests à effectuer peuvent être simplifiés.

La réalisation de l'invention peut nécessiter d'abord de recueillir et purifier les globules rouges
20 dans ces échantillons de sang, ou liquides sanguins, par des opérations simples et déjà connues, par exemple selon le procédé suivant.

Les globules rouges sont récupérés par centrifugation à basse vitesse. Le surnageant plasmatique
25 est séparé et remplacé par un liquide salin physiologique de type PBS ; contenant 9g/l de NaCl et tamponné à pH neutre. Après plusieurs lavages (3 à 5), la suspension de globules rouges est ainsi débarrassée des protéines du plasma. Le culot de globules rouges purifiés est
30 additionné de 1 ou 2 volumes d'eau distillée pour réaliser un choc osmotique qui entraîne la lyse des membranes des globules rouges et libère l'hémoglobine en solution concentrée et purifiée. Une étape de centrifugation à haute vitesse (10 à 20.000 t/mn) permet

d'éliminer les débris membranaires et cellulaires dans le culot. Une étape finale de filtration du surnageant sur membrane de porosité de 0,2 micron permet de préparer une solution d'hémoglobine purifiée et stérile, dépourvue de
5 particules et dérivés d'origine tissulaire, cellulaire ou membranaire. D'autres méthodes permettent de purifier l'hémoglobine à partir de sang congelé et hémolysé et d'éviter la purification préalable des globules rouges. Elles ont été décrites dans le brevet US 4764279 et
10 combinent des précipitations par l'éthanol et une chromatographie sur des supports échangeurs d'anions de type DEAE Cellulose, DEAE Spherox ou autres supports.

Le clivage Hème-Globine à pH acide a été décrit en présence d'alcool par SCHULZ dès 1898. ANSON et MIRSKY en
15 1930, puis ROSSI-FANELLI et coll. en 1958 utilisent l'acétone en présence d'acide à 0°C. TEALE (1959) préfère l'utilisation de la méthyl-éthyl cétone à la place de l'acétone. AUTIO et coll. (1984) séparent la globine à pH acide grâce à l'absorption et la précipitation de l'hème
20 avec la carboxyméthylcellulose soluble. La globine ainsi préparée est soluble à pH acide ou alcalin mais devient insoluble dès que le pH de la solution aqueuse est neutralisé entre pH 6 et 8. Grâce à cette propriété spécifique, il est possible de réaliser une précipitation
25 sélective de la globine en solution aqueuse à pH neutre, en présence d'une faible concentration saline voisine de 5g/l de chlorure de sodium, conditions dans lesquelles les autres protéines plasmatiques sont solubles, ne co-précipitent pas avec la globine et sont séparées dans le
30 surnageant. Cette méthode est utile lorsque l'on souhaite éviter une séparation préalable des globules rouges et du plasma, ce qui permet de congeler le sang aussitôt son prélèvement.

Des essais de solubilisation de la globine à pH physiologique sont déjà connus. Certains ont été réalisés par STRUMIA et coll. en 1951 et 1952 par un traitement alcalin prolongé qui entraîne une déamidation partielle de la globine au niveau des résidus asparagine et glutamine transformés respectivement en acide aspartique et acide glutamique (VARS 1952). D'autres essais de solubilisation ont été notamment réalisés par VOLCKMANN en 1988 par succinylation. Ces préparations de globine chimiquement modifiée, soluble à pH physiologique, ont été proposées comme substituts du plasma ou de l'albumine, par injection intraveineuse, chez des patients nécessitant une augmentation du volume sanguin circulant, à la suite d'une cirrhose hépatique, de pertes sanguines accidentelles, ou de grandes brûlures. Ces applications médicales n'ont pas vu le jour, malgré un développement clinique satisfaisant, (Strumia et al., 1952) ou ont été abandonnées rapidement notamment pour des raisons de toxicité à forte dose, ou d'élimination trop rapide par la voie rénale. Personne n'a pensé jusque maintenant, que cette globine chimiquement modifiée et soluble à pH physiologique, pouvait être utilisée pour la fabrication d'implants autologues ou homologues, destinés notamment au comblement, à la protection, ou à la cicatrisation des plaies internes ou cutanées.

La possibilité de réticuler la globine chimiquement modifiée, soluble et utilisable à forte concentration, en lui conférant un caractère insoluble en milieu physiologique explique la persistance de cette forme de globine après implantation tissulaire, ce qui la rend aussi relativement résistante à une dégradation enzymatique, surtout si la quantité injectée est importante, ce qui est le cas dans les applications de comblement ou d'augmentation tissulaire.

La vérification de l'intérêt de l'invention peut être facilement réalisée à partir d'une préparation de globine de porc chimiquement modifiée par traitement
5 alcalin prolongé ou par estérification des fonctions carboxyliques, ou par acétylation ou succinylation des fonctions amines, puis purifiée et déshydratée pour obtenir une poudre entièrement soluble en milieu aqueux physiologique. La poudre de globine ainsi préparée peut
10 être mise dans une seringue, stérilisée par l'oxyde d'éthylène ou irradiation à une dose de 5 à 25 ou 30kGray et redissoute à haute concentration dans une solution physiologique de PBS. Après mélange à température ambiante avec un agent réticulant adapté à la
15 modification chimique réalisée, tel que des diépoxydes, ou des aldéhydes, ou des polyaldéhydes, ou des polysaccharides oxydés, ou d'autres groupements réactifs, on obtient un gel visqueux et adhésif, parfaitement biocompatible et biodégradable. La poudre initiale ou la
20 solution de globine peuvent être additionnées d'autres adjuvants adhésifs connus, tels que l'acide hyaluronique, la carboxy-méthylcellulose, qui peuvent participer activement ou passivement à la constitution du réseau réticulé de globine et s'y trouvent piégés. Cette colle
25 biologique peut remplacer avantageusement les produits comparables préparés à partir de polymères synthétiques moins bien tolérés, ou de matériaux collagéniques qui nécessitent généralement l'emploi de moyens de chauffage pour être fluidifiés avant utilisation. Dans le cas d'une
30 préparation d'ethyl-globine ou d'autres esters de globine solubles à pH neutre, il est possible de l'utiliser sous forme de solution concentrée à pH neutre, reconstituée juste avant l'emploi à partir de poudre et de PBS en seringues séparées puis mélangées. Après injection dans

les tissus à combler ou à protéger, les fonctions esters de la globine seront rapidement hydrolysées et la globine retrouvera son caractère insoluble. Ceci souligne l'intérêt de l'estérification de la globine qui lui
5 confère une modification chimique réversible, par hydrolyse en milieu aqueux.

L'absence de pouvoir antigénique de la globine de lapin, chimiquement modifiée par succinylation a été vérifiée par immunisation de lapins avec ou sans adjuvant
10 de Freund par voie sous cutanée et intra musculaire. Les prélèvements de sang effectués après l'immunisation permettent de vérifier l'absence d'anticorps anti-globine ou anti-hémoglobine par les tests habituels de contrôle : Volckmann (1988). La modification chimique de la globine
15 solubilisée par traitement alcalin prolongé a été documentée par Vars et al. (1952) et sa biocompatibilité a été démontrée par Strumia et al. (1952)

Exemples de réalisation de produits selon l'invention.

20 **Exemple 1 : Préparation de globine de lapin, chimiquement modifiée, soluble à pH physiologique.**

Cinq lapins anesthésiés sont saignés par ponction cardiaque. Le sang est récupéré en présence d'héparine ou en présence de citrate de sodium pour éviter sa
25 coagulation. On obtient ainsi 210 ml de sang qui sont centrifugés pendant 30 minutes à 2500 t/mn. Le surnageant contenant le plasma est prélevé avec une pipette et le culot est lavé 5 fois par 3 volumes de tampon PBS, contenant 9 g/l NaCl et tamponné à pH 7.2. Le culot
30 final, lavé, est additionné, sous agitation, d'un volume égal d'eau distillée pour lyser les hématies. La suspension finale est centrifugée à 12 000t/mn pour éliminer des débris cellulaires et membranaires. Le

surnageant est filtré sur membrane d'acétate de cellulose de porosité 0.22 micron. On obtient 82 ml contenant 97 g/l d'hémoglobine.

L'hémoglobine est transformée en globine selon la
5 technique décrite par TAYOT et VERON (1983). Cette solution d'hémoglobine est versée sous agitation dans 275 ml d'éthanol 96% contenant 1 ml d'HCL concentré. Le pH est ajusté à 3. La concentration finale est de 74% d'éthanol et de 22g/l d'hémoglobine à pH acide. On ajoute
10 3 g de charbon actif L4S de la marque CECA sous agitation vigoureuse pendant 15 heures à 4°C. La suspension est centrifugée à 15 000t/mn pendant 30 minutes pour éliminer le charbon sous forme de culot. Le surnageant contenant la globine acide décolorée est filtré sur une série de
15 membranes poreuses jusqu'à la porosité la plus faible (0.2 micron) pour éliminer les particules fines de charbon. Le filtrat est ensuite précipité dans 10 volumes d'acétone. Le précipité acide de globine est lavé par l'acétone pour préparer une poudre acide, anhydre,
20 débarassée des sels. 4,5g de cette poudre sont dilués dans 100ml de NaOH 0,25 M, conformément à la publication de Strumia et al. (1951). La solution alcaline obtenue après 30 minutes d'agitation est limpide. Elle est ensuite incubée à 37°C pendant 27 heures, puis
25 neutralisée à un pH voisin de 7,2, par addition d'une solution d'acide chlorhydrique. La solution neutralisée reste limpide. La globine en solution est ensuite précipitée par addition de 10 volumes d'acétone. Le précipité est récolté par filtration sur toile poreuse,
30 puis lavé par l'acétone pour obtenir une poudre anhydre, neutre et spontanément soluble dans l'eau ou une solution physiologique à pH neutre.

Exemple 2 : Préparation de globine humaine, chimiquement modifiée, soluble à pH physiologique.

200 ml de sang humain périmé, prélevé sur citrate de sodium sont centrifugés pendant 30 mn à 2500 t/mn. Le surnageant contenant le plasma est prélevé avec une pipette en aspirant aussi la couche cellulaire blanchâtre superficielle correspondant aux leucocytes. Le culot de globules rouges est lavé 5 fois avec 3 volumes de solution physiologique PBS, contenant 9 g/l NaCl et tamponné à pH 7.2, par des centrifugations successives. Le culot final est additionné de 2 volumes d'eau distillée pour lyser les hématies. La suspension hémolysée est clarifiée par centrifugation pendant 30 mn à 12000t/mn et filtrée sur membrane de porosité 0.2 micron. On obtient 210 ml contenant 52 g/l d'hémoglobine qui sont conservés à 4° C. Cette solution est lentement versée sous agitation dans 4 l d'acétone, contenant 40 ml d'HCl 10 N. La suspension est agitée vigoureusement et laissée au repos pendant 1 heure à température ambiante, sous une hotte chimique. L'hème dissout dans l'acétone est éliminé par filtration sur toile poreuse et le précipité de globine décolorée est récupéré, lavé en acétone et séché sous courant d'air.

En variante, divers acides minéraux (sulfurique, chlorhydrique, phosphorique...) ou carboxyliques, tels que l'acide acétique, l'acide oxalique, ou l'acide citrique par exemple, peuvent être utilisés pour acidifier la solution d'acétone ou la solution d'hémoglobine avant sa décoloration.

Une autre variante de ce procédé consiste à précipiter la solution acide d'hémoglobine avant sa décoloration. La précipitation peut être réalisée par addition de NaCl à une concentration de 40 à 60 g/l. Le précipité d'hémoglobine acide est ensuite décoloré par

suspension dans un volume suffisant d'éthanol ou/et d'acétone. Le pigment passe en solution dans l'éthanol ou/et l'acétone ; la globine reste sous forme précipitée et peut être récoltée par filtration sur toile poreuse.

5 Grâce à l'élimination de toute phase aqueuse, cette variante permet de réduire le volume nécessaire d'éthanol ou/et d'acétone d'un facteur au moins égal à 5.

Le précipité acide de globine décolorée, contenant des sels, est ensuite lavé par une solution aqueuse

10 d'acétone contenant au moins 90% d'acétone, puis lavé par l'acétone anhydre et séché pour préparer une poudre acide, débarrassée des sels. 4,5g de cette poudre sont dilués dans 100ml de NaOH 0,25 M et incubés à +20°C pendant 24 heures, puis traités comme dans l'exemple 1.

15 La solution est neutralisée à un pH voisin de 7,2 par addition d'une solution d'acide chlorhydrique. La globine est ensuite précipitée par addition d'au moins 10 volumes d'acétone. Le précipité est récolté par filtration sur toile poreuse, puis lavé par l'acétone et séché, pour

20 obtenir en final une poudre neutre et soluble dans l'eau ou une solution physiologique.

Plusieurs variantes permettent de préparer, de la globine partiellement ou totalement soluble, par une incubation alcaline plus courte, ou à une concentration

25 inférieure à 1N. A titre d'exemples, des traitements en soude NaOH de concentration 0,1 à 1N pendant 4 à 24 heures, à température ambiante sont possibles. Lorsque la concentration de soude, ou d'une autre base alcaline, est augmentée le temps d'incubation ou/et la température

30 doivent être diminués.

Exemple 3: Autre préparation de globine humaine, modifiée chimiquement, soluble à pH physiologique.

On réalise le procédé de l'exemple 1 à partir de culot globulaire contrôlé et périmé obtenu auprès d'un centre de transfusion sanguine. On obtient une poudre neutre de globine humaine, chimiquement modifiée, soluble dans l'eau ou un liquide physiologique, biocompatible et implantable par injection ou chirurgicalement.

Exemple 4: Autre préparation de globine humaine, modifiée par succinylation, soluble à pH physiologique.

10 Cette préparation est réalisée conformément aux travaux de Volckmann (1988). Le précipité acide de globine décolorée, contenant des sels, est lavé par une solution d'acétone, contenant assez d'eau pour dissoudre les sels sans dissoudre la globine, puis lavé par 15 l'acétone anhydre et séché pour préparer une poudre, acide, débarrassée des sels. Cette poudre est reprise à une concentration de 30 mg/ml, en solution de NaOH 1g/l contenant 9 g/l de NaCl, puis additionnée de 80 mg d'anhydride succinique par gramme de globine, à une 20 température de 20°C. Le pH décroît spontanément jusqu'à 9, où il est maintenu par addition progressive de NaOH, avec contrôle continu au pH mètre. La réaction est terminée lorsque le pH est stable. Après 1 heure d'attente, la solution est ajustée à pH neutre et 25 précipitée par une solution aqueuse d'acétone à 90%. Le précipité est lavé par de l'acétone anhydre puis séché. On obtient une poudre neutre de globine soluble en solution physiologique à pH neutre.

30 **Exemple 5: Autre préparation de globine humaine, modifiée par estérification, soluble à pH physiologique.**

On réalise la préparation de précipité de globine humaine selon l'exemple 2. Le précipité acide de globine décolorée, contenant des sels, est ensuite lavé par une solution aqueuse d'acétone contenant au moins 90% d'acétone, puis lavé par l'acétone anhydre et séché pour
5 préparer une poudre acide, débarrassée des sels.

On pèse 800mg de poudre de globine humaine, finement divisée, dans un flacon de 25ml, auquel est ajouté 20ml de méthanol anhydre, contenant 0,2ml d' HCl 12N, soit une
10 concentration acide finale de 0,12N. La poudre reste parfaitement insoluble dans ces conditions, gonfle un peu et se disperse bien. Après bouchage hermétique du flacon, une incubation d'une semaine est réalisée à température ambiante sous agitation modérée plusieurs fois par jour.

15 Le précipité de globine est séparé du méthanol acide, à l'aide d'un filtre nylon de porosité 1µm. Le précipité est lavé par deux fois 20ml d'acétone pure, puis séché à l'air pour obtenir 740mg d'une poudre fine bien divisée.

Cette poudre peu mouillable spontanément, peut être
20 rapidement dissoute dans 20ml d'eau distillée, dans un petit bécher. On obtient une solution limpide jaune paille, de pH 2,8. La neutralisation du pH de cette solution par addition goutte à goutte de soude 0,5N, sous agitation manuelle et avec contrôle continu du pH permet
25 de vérifier le caractère soluble de la globine à pH neutre entre 6 et 8, puis sa précipitation massive à un pH alcalin voisin de 9,5 à 10.

Il est possible d'observer un début de précipitation vers pH5, lorsque la poudre de départ n'est pas finement
30 divisée. Ceci correspond à la présence partielle de globine non modifiée, protégée de la réaction d'estérification au cœur d'un gros agrégat de poudre. La méthylglobine ainsi préparée pourrait manifester une certaine toxicité à haute dose. En effet, in vivo, en

présence des liquides aqueux physiologiques, il y a une hydrolyse spontanée des fonctions esters méthyliques, avec libération de méthanol toxique à hautes doses et régénération progressive de la globine initiale. Pour
5 éviter ce risque théorique, la réaction d'estérification peut s'effectuer en remplaçant le méthanol par de l'éthanol, de préférence à d'autres alcools moins réactifs. Dans ce cas on obtient un ester éthylique d'éthylglobine, dépourvu de toxicité pour l'organisme,
10 même à forte dose. Il est à noter que les esters de globine ainsi préparés sont progressivement hydrolysés in vivo et régénèrent spontanément la globine insoluble initiale, qui elle-même sera dégradée. Il s'agit donc d'une modification parfaitement réversible. Il est donc
15 préférable de préparer de tels produits finis sous forme sèche, ou non aqueuse, de manière à éviter une dégradation préalable à leur emploi. Il est à noter aussi que les esters de globine ainsi préparés possèdent une charge électrique positive très marquée. Leur point
20 isoélectrique basique, voisin de 10, provient de la disparition plus ou moins complète des fonctions carboxyliques. Cette propriété leur confère un caractère adhésif vis-à-vis des tissus chargés négativement. Ces esters de globine possèdent une grande quantité de
25 fonctions amines qui peuvent être facilement réticulées par des réactifs à fonctions aldéhydes, tels que le glutaraldéhyde, ou les polysaccharides oxydés. En outre, ils peuvent facilement former des réseaux stables grâce à des liaisons électrostatiques fortes, en présence de tous
30 polymères ou biopolymères chargés négativement, tels que le fibrinogène, la fibrine, l'albumine, les hyaluronates, l'héparine ou tous les autres polysaccharides sulfatés, ou riches en fonctions carboxyliques.

Exemple 6 : Préparation d'une poudre stérile de globine chimiquement modifiée et soluble à pH 7,2.

Utilisation en spray sec ou liquide pour faciliter la cicatrisation des plaies.

5 En suivant l'un des exemples 2 à 5, on prépare de la poudre de globine humaine, chimiquement modifiée, soluble à pH neutre en solution physiologique. Cette poudre est conditionnée en flacons étanches bouchés et stérilisés, en présence de carboglace à -80°C, par bêta ou gamma-
10 irradiation, à une dose de 5 à 25 ou 30kGray.

Après contrôles, la poudre reste soluble dans une solution de pH neutre, physiologique de type PBS, jusqu'à une concentration d'environ 50%.

En variante, la poudre peut aussi être stérilisée
15 par l'oxyde d'éthylène qui permet une modification chimique complémentaire par greffage de groupements hydroxy-ethyle sur la globine. Cette poudre peut être appliquée sur une plaie cutanée par pulvérisation, pour combler la perte de substance tissulaire. La poudre de
20 globine soluble possède des propriétés adhésives au contact d'une plaie. Ceci facilite son utilisation. Elle permet une absorption des exsudats de la plaie qui dissolvent progressivement la poudre de globine, en formant une solution visqueuse qui se dilue
25 progressivement. Ceci apporte des nutriments directement assimilables par les tissus lésés et favorise la formation du tissu de granulation, première étape nécessaire dans le processus de cicatrisation. Dans une variante, la poudre est d'abord dissoute en PBS à une
30 concentration élevée, supérieure à 30%, puis appliquée par pulvérisation liquide. Une telle solution de 10 à 30% peut être préparée par mélange de la poudre et de PBS dans une seringue stérile avant l'emploi, puis injectée par voie intradermique en vue du comblement de rides, ou

pour les autres applications connues d'augmentation tissulaire. Il est intéressant d'utiliser l'ethyl-globine dans cette indication, car après hydrolyse, elle retrouve son caractère initial d'insolubilité, stoppant sa
5 diffusion, ce qui prolonge et améliore son activité.

Enfin la poudre ou le liquide de globine soluble peuvent être utilisés en association avec un pansement adapté à la plaie à traiter.

10 **Exemple 7 : Préparation d'un mélange de poudre de globine soluble telle que préparée dans l'exemple 5, avec une poudre de globine insoluble.**

Utilisation comme agent de comblement des plaies et de cicatrisation.

15 L'exemple décrit la préparation de ce produit à partir de globine de porc et son utilisation dans la cicatrisation de plaies cutanées profondes chez le porc.

L'exemple 2 est reproduit à partir de sang de porc dont les globules rouges sont purifiés, puis lysés pour
20 extraire l'hémoglobine. La globine de porc est préparée selon le protocole décrit dans l'exemple 2, 3, 4 ou 5 et permet d'obtenir une poudre de globine, modifiée chimiquement et devenue soluble à pH physiologique.

Une seconde préparation de poudre de globine
25 insoluble à pH physiologique est obtenue en suivant l'exemple 2, avec une variante qui consiste à supprimer le traitement alcalin de modification chimique. Cette poudre est obtenue de la manière suivante, conformément à l'enseignement du brevet FR 2854801.

30 Après décoloration de l'hémoglobine de porc par une solution d'acétone acide, le précipité de globine acide est séparé puis redissout dans une solution aqueuse à pH 3. La solution est filtrée sur une membrane stérilisante de porosité 0.22 microns. La globine est précipitée par

neutralisation à pH 7.2. Ce précipité neutre est dissout, à nouveau, dans 3 volumes de soude NaOH 0.1 M à 1M et incubé à 20°C pendant 1 heure sous agitation. Ce traitement alcalin n'est pas suffisant pour entraîner une
5 modification significative de la globine qui demeure insoluble à pH neutre. Puis la solution alcaline est acidifiée à pH 3 par addition d'une solution d'acide chlorhydrique 3N. Le précipité de globine acide qui se forme contient des sels. Il est lavé par une solution
10 aqueuse d'acétone contenant environ 90% d'acétone et contenant assez d'eau pour dissoudre les sels sans dissoudre la globine acide. Ce lavage permet l'élimination des sels du précipité. L'eau du précipité est ensuite éliminée par lavage en acétone pure et la
15 poudre sèche de globine acide est obtenue par évaporation de l'acétone sous vide. En variante, une poudre de globine de pH neutralisé, insoluble à pH physiologique, préparée par précipitation acétonique ou lyophilisation pourrait être utilisée.

20 2 grammes de poudre de globine acide (insoluble à pH neutre) sont mélangés avec 8 grammes de poudre de globine soluble et à pH neutre, dans un flacon fermé. Le mélange homogène des deux poudres est ensuite stérilisé, par irradiation gamma à une dose de 5 à 25 ou 30 kGray et
25 peut être directement utilisé comme agent de comblement et cicatrisation de plaies cutanées externes ou de plaies chirurgicales internes. D'autres proportions variant de 1 à 99% de poudre soluble dans le mélange peuvent être utilisées. Le poids de poudre appliqué par plaie peut
30 lui-même varier, en fonction de cette proportion et de l'effet osmotique de pompage recherché sur la plaie.

Une expérimentation sur des plaies cutanées profondes, rectangulaires de 2x3 cm de côté, créées chez le porc, permet de vérifier l'intérêt de cette poudre de

globine dans le processus de cicatrisation. Le volume de la plaie est comblé, au moins pour moitié et les plaies sont ensuite recouvertes par un pansement occlusif non adhérent de type OPSITE®. Le corps du porc est ensuite
5 recouvert d'un pansement serré qui protège les plaies de toute contamination externe. Tous les 3 à 4 jours, les plaies sont nettoyées à l'eau physiologique, mais le produit de comblement reste parfaitement intégré à la plaie et n'est ni enlevé, ni remplacé.

10 La présence d'une partie soluble dans la poudre permet l'aspiration et le drainage des fluides physiologiques « exsudats » de la plaie, qui dissolvent la globine soluble, hydratent et neutralisent la poudre de globine insoluble et libèrent des nutriments
15 importants pour les cellules et le développement du tissu de granulation. L'espace interstitiel ainsi libéré permet une migration et une colonisation cellulaire optimale de l'implant. Ces fluides et les cellules migrent et s'adsorbent sur les granules de globine insoluble et
20 favorisent un comblement rapide par le tissu de granulation. Cet agent de comblement parfaitement toléré, dégradé en moins de deux semaines, diminue de manière significative la contraction par les berges de la plaie et favorise une cicatrisation harmonieuse en moins de
25 quatre semaines, caractérisée par une épithélialisation complète de bonne qualité.

De la même manière il est possible de préparer le même produit à partir de globine humaine, pour une utilisation dans la cicatrisation des plaies de brûlés ou
30 des plaies chroniques de patients âgés, ulcères d'origine diabétique, ou d'insuffisance veineuse ou artérielle, ou escarres. Le caractère homologue de la globine réduit à son minimum la réaction inflammatoire généralement observée au contact de biomatériaux moins bien tolérés.

Exemple 8 : Préparation d'une poudre de globine soluble telle que préparée dans l'exemple 5, et association avec une éponge, un tissu ou une poudre de cellulose oxydée.

- 5 **Utilisation comme agent de comblement des plaies et de cicatrisation.**

Deux grammes de poudre de globine humaine soluble à pH physiologique, sont préparés selon l'exemple 5.

- Des éponges mixtes de globine soluble et de cellulose oxydée sont obtenues par lyophilisation d'une suspension aqueuse de cellulose oxydée à 1% à pH 7.2, contenant 0.2 à 2% de globine soluble au même pH. La cellulose oxydée peut être aussi sous forme de tissu ou tricot bi ou tridimensionnel. Les éponges lyophilisées de dimension rectangulaire 5x7cm et d'épaisseur 3mm contiennent 105 mg de cellulose oxydée et de 20 à 210 mg de globine soluble. Ce produit peut être stérilisé par exemple par l'oxyde d'éthylène et utilisé comme agent de comblement et de cicatrisation des brûlures et des plaies chroniques cutanées externes ou chirurgicales internes, comme dans l'exemple précédent.

- D'autres biomatériaux, notamment les collagènes, le chitosan et d'autres polymères connus pour le traitement des plaies, peuvent être utilisés à la place de la cellulose oxydée, en association avec la poudre de globine soluble.

Exemple 9 : Préparation d'une solution de globine, chimiquement modifiée, soluble à pH 7,2.

- 30 **Utilisation pour le comblement de tissus cutanés ou pour protéger des plaies, et assurer leur étanchéité**

1 gramme de poudre de globine, soluble à pH neutre, préparée suivant l'exemple 5, est réparti à sec dans une seringue de 5ml. La seringue remplie et bouchée est

stérilisée par irradiation bêta (faisceau d'électrons) à une dose de 5 à 25 ou 30kGray. Cette seringue est connectée à une seconde seringue stérile contenant de 2 à 10ml de solution physiologique, grâce à un connecteur luer à deux extrémités, de 2mm de diamètre interne. La solution est injectée dans la seringue contenant la poudre. Des allers-retours successifs permettent de préparer une solution homogène de globine neutre, visqueuse, concentrée de 10 à 50%. Une telle préparation à une concentration de 10 à 30% peut être injectée par voie intradermique pour le comblement de rides, ou par toute autre voie pour l'augmentation du volume d'une structure tissulaire, à l'exception de la voie intravasculaire qui est proscrite.

Une troisième seringue stérile contenant 0.5 ml de glutaraldéhyde à 0.2% ou 0.5 ml d'amidon oxydé à 3% peut être associée en parallèle avec la seringue contenant la solution de globine à une concentration de 30 à 50%, dans un kit de mélange des deux composants. En poussant sur les deux seringues en même temps, on obtient un mélange ou gel adhésif, qui se réticule en quelques secondes ou minutes et durcit. Le temps de prise en masse est réglable par les concentrations respectives de globine et d'agent réticulant. Cet adhésif peut être utilisé pour les diverses applications chirurgicales qui nécessitent ce type de produit, ou pour la couverture ou la protection des plaies cutanées ou chirurgicales.

Dans une première variante, la seringue de globine, ou la seringue contenant l'agent réticulant peuvent être additionnées d'un adjuvant adhésif, tel que l'acide hyaluronique ou d'autres polymères chargés négativement, tels que la carboxyméthylcellulose. Ce polymère s'incorpore dans le réseau du gel de globine, au moment

de sa réticulation, en augmente le pouvoir adhésif et la viscosité et favorise son adhésion à la plaie à traiter.

Dans une seconde variante, la seringue contenant la globine liquide concentrée peut contenir de l'air ou tout
5 autre gaz et peut être mélangée à la seringue contenant l'agent réticulant par des allers-retours successifs de seringue à seringue, immédiatement avant d'être appliquée sur les tissus à protéger, sous forme de mousse fluide adhésive. Après quelques secondes ou minutes, en fonction
10 de la quantité d'agent réticulant et de la concentration de la solution de globine, la mousse durcit et reste fixée aux tissus sur lesquels elle a été appliquée. Enfin cette solution ou mousse adhésive peut être mélangée à une colle de fibrine au moment de sa préparation. Cette
15 dilution de la colle de fibrine permet d'augmenter son volume sans réduire son pouvoir adhésif, le complexe ainsi créé possède des propriétés de cicatrisation et de comblement.

20 **Exemple 10 : Préparation d'une pâte ou d'une suspension insoluble réticulée. Application comme agent de comblement de plaies ou comme matériau injectable d'augmentation tissulaire.**

Le produit adhésif décrit dans l'exemple précédent
25 peut être appliqué sur une plaie externe ou interne, pour la protéger ou favoriser sa cicatrisation. Il peut aussi être injecté à l'aide d'aiguilles fines, avant sa prise en masse, dans des sites intradermiques ou sous-cutanés pour créer ou restaurer un volume ou corriger une ride.

30 Une variante pour la préparation d'un produit non soluble injectable consiste à soumettre une suspension de granules de globine soluble, préparés selon l'exemple 2, 3, 4 ou 5, à une réticulation secondaire par un agent de réticulation approprié au type de modification chimique

de la globine, tel que par exemple : un diépoxyde, en particulier le 1-4 butane-diol-diglycidyl-ether, notamment pour l'acetyl ou la succinylglobine, le glutaraldéhyde, ou un polysaccharide oxydé sous forme de polyaldéhyde

5 macromoléculaire, notamment pour les esters de globine ou les dérivés obtenus par traitement alcalin. Après réticulation et lavage à pH neutre, la suspension de concentration voisine de 15% peut être répartie en seringues et stérilisée, notamment par autoclave à 120°C

10 ou par irradiation bêta ou gamma de 5 à 25 ou 30kGray, par exemple sous forme congelée en présence de carboglace. Pour faciliter son injection à travers de fines aiguilles, un agent lubrifiant tel que l'acide hyaluronique ou la gélatine peut être nécessaire, tout en

15 permettant la stérilisation finale. En variante, l'agent fluidifiant peut être conditionné dans une autre seringue séparée et peut être stérilisé indépendamment par les moyens connus, tels que l'autoclavage à 120°C. Le mélange avec la globine peut se faire ensuite à l'aide d'un kit

20 stérile contenant les deux seringues de globine et d'agent fluidifiant. Ces deux seringues sont équipées d'un embout Luer femelle et peuvent être reliées grâce à un connecteur stérile possédant deux embouts Luer mâles. Leur mélange homogène se fait par poussée du contenu

25 d'une seringue dans l'autre et réciproquement, en effectuant plusieurs aller-retours. Une dizaine d'aller-retours suffit en général à obtenir une suspension pâteuse et visqueuse homogène, prête à être injectée.

30 **Exemple 11 : Préparation d'un film sec soluble, à partir de globine chimiquement modifiée, soluble à pH 7,2. Application à la protection des plaies et à la prévention d'adhérences post-opératoires.**

Le produit gel ou mousse, préparé selon l'exemple 9, en omettant l'addition de l'agent réticulant, peut être déposé sur une surface plane. Après séchage, on obtient un film solide dont l'épaisseur peut être réglée par la
5 hauteur du dépôt et dont la souplesse peut être ajustée par addition d'un agent plastifiant tel que, par exemple, le glycérol ou le polyéthylène-glycol. Ce film peut être utilisé dans la protection ou la cicatrisation des plaies internes ou externes, soit directement par adhésion
10 spontanée, soit après fixation par un agent adhésif tel que l'amidon oxydé, soit par application d'un faisceau laser, si un colorant a été introduit dans le film. Dans une variante, le gel initial peut être coulé, en incorporant un treillis constitué de fils résorbables ou
15 non résorbables. Dans ce cas, la membrane finale, obtenue après séchage, peut être suturée. Le film et la membrane possèdent des propriétés de prévention des adhérences chirurgicales.

20 **Exemple 12: Préparation d'un film insoluble, à partir de globine chimiquement modifiée, soluble à pH 7,2, puis réticulée par un polyaldéhyde.**
Application à la protection des plaies et à la prévention d'adhérences post-opératoires.

25 Le produit gel ou mousse, préparé selon l'exemple 9 peut être déposé sur une surface plane, sur une certaine épaisseur, avant sa prise en masse. Lorsque la réticulation est terminée, on obtient un film solide dont l'épaisseur peut être réglée par déshydratation partielle
30 ou totale. Ce film peut être utilisé comme dans l'exemple 11, dans la protection ou la cicatrisation des plaies internes ou externes. Il possède des propriétés de prévention des adhérences chirurgicales.

Exemple 13 : Préparation de solides par moulage à partir des gels adhésifs réticulés obtenus selon l'exemple 9. Utilisation comme implants pour la délivrance retardée de médicaments dans l'organisme.

5 Le gel ou la mousse adhésive préparés selon l'exemple 9 peuvent être moulés pour acquérir la forme et le volume souhaités pour l'implant. Un médicament peut être ajouté dans la masse pour permettre une délivrance progressive et retardée et obtenir un effet
10 pharmacologique prolongé.

Exemple 14: Applications médicales des implants de globine chimiquement modifiée et secondairement réticulés pour devenir insolubles.

15 Les implants de globine chimiquement modifiée, solubles ou rendus insolubles par réticulation, par exemple ceux préparés selon l'un quelconque des exemples 9, 10, 12 et 13, peuvent être utilisés dans les applications suivantes non limitatives :

20 -Cicatrisation, protection ou comblement de plaies cutanées externes ou chirurgicales internes.
-Comblement des rides et défauts cutanés
-Comblement des tissus conjonctifs ou sphincters pour des applications en urologie : reflux vésico-urétéral de
25 l'enfant, incontinence d'effort de la femme ; en O.R.L. : correction de volume des cordes vocales.
-Bouchon adhésif et hémostatique pour les plaies tissulaires ou les plaies artérielles percutanées.
-Moyen de fixation de prothèses ou biomatériaux sur les
30 tissus receveurs, notamment pour la fixation des dispositifs de renfort pariétal et viscéral.
-Films, gels et membranes pour prévention des adhérences post opératoires, utilisés seuls ou en association avec d'autres dispositifs médicaux.

Exemple 15: Applications médicales des implants de globine chimiquement modifiée et solubles à pH physiologique.

5 Les implants de globine chimiquement modifiée, solubles, par exemple, ceux préparés, selon l'un quelconque des exemples 1 à 7, 9 et 11 peuvent être utilisés dans les applications suivantes non limitatives :

10 Cicatrisation cutanée, par utilisation de la poudre neutre et soluble par pulvérisation ou application topique sur la plaie ouverte. Cette application peut être réalisée directement à partir de la poudre ou après dissolution dans un liquide physiologique ou une colle de
15 fibrine. Cette application peut être en association avec d'autres produits de cicatrisation ou facteurs de croissance. Une formulation préférée est réalisée par un mélange de poudre de globine insoluble à pH physiologique, préparée selon l'enseignement du brevet FR
20 2854801 et de poudre soluble à pH physiologique de globine chimiquement modifiée, réalisée selon l'exemple 5 ci-dessus.

La proportion préférée calculée en poids sec est de 30 à 10% de poudre insoluble pour 70 à 90% de poudre
25 soluble. Cette poudre s'imprègne progressivement de l'exsudat naturel de la plaie, par pompage osmotique grâce à la fraction de poudre soluble qui stimule aussi la colonisation par les fibrocytes. La fraction de poudre insoluble reste dans la plaie et inhibe sa contraction.
30 La poudre insoluble participe aussi à la stimulation du tissu de granulation, et de la néosynthèse de collagène. Elle s'intègre au tissu de granulation avant de disparaître en une à deux semaines par biodégradation.

Cicatrisation du cartilage ou de l'os, par utilisation de la poudre de globine chimiquement modifiée, soluble à pH physiologique, seule ou en association avec d'autres produits de cicatrisation
5 osseuse: phosphate de calcium, carbonate de calcium, hydroxyapatite, facteurs de croissance de type BMP, associés ou non à de la poudre de globine insoluble préparée selon l'enseignement du brevet FR 2854801.

Association à des antibiotiques pour inhiber le
10 développement bactérien, pendant la période de colonisation et dégradation de l'implant.

La présente invention a donc également comme objet l'utilisation d'un matériau susceptible d'être obtenu à partir de globine modifiée pour être soluble à pH
15 physiologique, pour la réalisation d'une préparation selon l'invention, adaptée à l'application correspondante.

D'une façon générale, quelle que soit la préparation selon l'invention, les méthodes sont à visée
20 thérapeutique. Des méthodes de comblement de rides peuvent, suivant les personnes concernées, être à visée simplement cosmétique. Dans tous les cas, la méthode selon l'invention comporte l'étape d'implanter localement, dans ou sur le tissu du patient ou de la
25 personne, qui en a besoin, une quantité thérapeutiquement ou cosmétiquement efficace, d'une préparation selon l'invention, notamment pour les applications précitées.

Comme cela a été décrit ci-dessus, notamment dans l'exemple 10, les préparations selon l'invention, quelle
30 que soit leur forme, peuvent, de préférence, être stérilisées par irradiation beta ou gamma, de préférence entre 5 et 25 ou 30 kGray, par exemple sous forme congelée, notamment en présence de carboglace, de préférence dans leur conditionnement final. Il en est de

même des préparations de globine insoluble au pH neutre décrites dans les demandes ou brevets FR 2 854 801 et US 6 949 652, qui sont incorporés ici par référence. Quand les préparations selon l'invention ou les demandes et
5 brevets incorporés par référence comportent un mélange de globine et d'un ou plusieurs composants stérilisables à la chaleur ou autoclavage, on préfère irradier la globine et stériliser séparément ce ou ces composants avant de
10 les mélanger de façon stérile, par exemple, en utilisant les seringues comme décrit dans l'exemple 10. Ainsi, par exemple, on peut réaliser une préparation stérile en kit contenant une seringue d'une pâte de globine insoluble à pH physiologique, stérilisée par irradiation, et une
15 seringue d'agent lubrifiant, par exemple d'acide hyaluronique ou hyaluronate stérilisé par autoclavage, avec des moyens usuels pour mélanger stérilement les contenus des deux seringues.

Bibliographie

- ANSON M.L. - MIRSKY A.E. (1930)
- 5 Protein Coagulation and its reversal. The preparation of insoluble globin, soluble globin and heme.
J. Gen. Physiol. 13, 469-476
- AUTIO K - KIESVAARA M. - MALKKI Y. - KANKU S. (1984)
- 10 Chemical and functional properties of blood globin prepared by a new method
Journal of Food Science 49, 859-862
- BERG J.W. - ORTMEYER D.W. - OTT D.L. - JACKSON R.L.
- 15 (1953)
Comparison of Globin Insulin and NPH Insulin
Diabetes, 2, 5, p.365-369
- RABINOWITCH I.M. - FOWLER A.F. - BENSLEY E.H. - GORDON
- 20 A.L. - MOUNTFORD M. (1947)
Globin Insulin
The Canadian Medical Association J., 56, 6, p.595-605
- REINER L. (1939)
- 25 Insulin preparation
US Patent # 2161198
- REINER L. - SEARLE D.S. - LANG E.H. (1939)
- Insulin preparations with prolonged activity
- 30 I. Globin Insulin
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 40, p.71

- ROSSI-FANELLI A. - ANTONINI E. -CAPUTO A. (1958)
Studies on the structure of haemoglobin
I-Physicochemical properties of human globin
Biochem. Biophys. Acta 30, 608-615
- 5 SCHULZ F.N. (1898)
Der Eiweisskörper des hämoglobins
Ztsch. F. physiol. chem. 24, 449-460
- 10 STRUMIA M.M. - SAMPLE A.B. - MAWR B. (1951)
Modified globin
I-Method for preparation from human erythrocytes.
J. Lab.and Clin.Med. 37, 959-968
- 15 STRUMIA M.M. - Mc GRAW J.J. - SAMPLE A.B. - MAWR B.
(1952)
Modified globin
IV- Some of the physiological properties of modified
human globin
20 J. Lab.and Clin. Med. 40, 2, 211-222
- TAYOT J.L. - VERON J.L. (1983)
Brevet Institut Mérieux : FR 8311324
Process for preparing globin from haemoglobin and globin
25 obtained by this process.
US Patent 4543209 (1985)
- TEALE F.W.J. (1959)
Cleavage of the haem-protein link by acid methyl-ethyl
30 keton
Biochem. Biophys. Acta 35, 543

VARIS H.M. - BOXER G.E. - MAWR B. (1952)

Modified Globin

II- Chemical changes in human globin by alkaline
modification

5 J. Lab. and Clin. Med. 39, 5, 743-751

VOLCKMANN H. (1988)

Essais de développement d'un substitut plasmatique
d'origine placentaire.

10 Thèse d'ingénieur CNAM Lyon.

REVENDICATIONS

1- Préparation implantable, l'implantation par voie intraveineuse ou par voie intraartérielle étant exclue, 5 comprenant un matériau susceptible d'être obtenu à partir de globine modifiée, notamment chimiquement pour être, au moins partiellement, soluble à pH physiologique, ledit matériau étant biocompatible, et biodégradable dans l'organisme, ladite préparation se présentant sous forme 10 solide, pâteuse, de gel, de suspension ou de solution, étant entendu que lorsque la préparation est sous forme de solution injectable et que ladite globine modifiée, notamment chimiquement pour être, au moins partiellement, soluble à pH physiologique, en forme le constituant actif 15 principal, la concentration en ladite globine modifiée est au moins de 10%.

2- Préparation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la globine est une globine d'origine humaine.

20 3- Préparation selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que la globine a été modifiée chimiquement par traitement alcalin, notamment à la soude, et/ou par acétylation ou succinylation.

25 4- Préparation selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que la globine a été modifiée par estérification de ses fonctions carboxyliques, notamment par méthylation ou éthylation.

5- Préparation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ledit matériau est sensiblement

soluble à pH physiologique.

6- Préparation selon la revendication 5, caractérisée en ce que ledit matériau est ou comporte ladite globine modifiée pour être soluble à pH
5 physiologique.

7- Préparation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ledit matériau est sensiblement insoluble à pH physiologique.

8- Préparation selon la revendication 7,
10 caractérisée en ce que ledit matériau insoluble a été obtenu par réticulation de ladite globine soluble à pH physiologique.

9- Préparation selon la revendication 8, caractérisée en ce que cette réticulation est effectuée
15 par un agent de réticulation approprié au type de modification chimique de la globine, notamment un diépoxyde, notamment le 1-4 butane-diol-diglycidyl-ether, notamment pour l'acetyl ou la succinylglobine, ou le glutaraldéhyde, ou un polysaccharide oxydé sous forme
20 de polyaldéhyde macromoléculaire, notamment pour les esters de globine ou les dérivés obtenus par traitement alcalin.

10- Préparation selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'elle comporte, à la fois, un
25 desdits matériaux soluble à pH physiologique et un desdits matériaux insoluble à pH physiologique.

11- Préparation selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'elle comprend également un autre matériau, notamment de comblement, biocompatible,

et stérile, insoluble à pH physiologique.

12- Préparation selon la revendication 11, caractérisée en ce que ledit autre matériau comprend de la globine biodégradable, stérile, et insoluble à pH
5 physiologique.

13- préparation selon l'une des revendications 11 et 12, caractérisée en ce que ledit autre matériau est choisi dans le groupe constitué par les celluloses oxydées, les collagènes et le chitosan.

10 14- Préparation selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme de suspension, pâte, ou gel injectable.

15 15- Préparation selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme solide.

16- Préparation selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'elle se présente sous l'une des formes suivantes:

- poudre ou granules,
- 20 - film, membrane ou treillis,
- éponge,
- implant solide préformé.

17- Préparation selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme
25 d'une solution injectable,

18- Préparation selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'elle comporte un ester de globine, notamment ethyl-globine, sous forme de solution

concentrée à pH neutre, la concentration en ledit ester de globine étant au moins de 10%.

19- Préparation selon la revendication 16, caractérisée en ce qu'elle comprend une poudre de globine
5 modifiée pour être soluble, au moins partiellement, à pH physiologique,

20- Préparation selon la revendication 19, caractérisée en ce qu'elle comporte, de plus, un agent réticulant, leur mélange formant une colle adhésive sur
10 les tissus organiques.

21- Préparation selon la revendication 20, caractérisée en ce que ledit agent réticulant est lui-même sous forme de poudre, l'ensemble pouvant former une colle en présence d'un milieu liquide, notamment liquide
15 physiologique.

22- Préparation selon l'une des revendications 19 à 21, comprenant ladite globine modifiée pour être soluble à pH physiologique, caractérisée en ce qu'elle comprend également un matériau solide insoluble à pH
20 physiologique obtenu à partir de ladite globine.

23- Préparation selon l'une des revendications 19 à 22, comprenant ladite globine modifiée pour être soluble à pH physiologique, caractérisée en ce qu'elle comprend également un autre matériau solide, à savoir de la
25 globine biodégradable, stérile et insoluble à pH physiologique.

24- Préparation selon l'une des revendications 22 et 23, caractérisée en ce que ledit autre matériau est

sous forme de poudre.

25- Préparation selon l'une des revendications 19 ou 20 à 24, comprenant ladite poudre de globine modifiée pour être soluble à pH physiologique, caractérisée en ce
5 qu'elle est formulée sous forme de spray ou aérosol sec.

26- Préparation selon l'une des revendications 19 ou 20 à 24, caractérisée en ce que ladite globine modifiée est associée à un pansement solide.

27- Préparation selon la revendication 16,
10 caractérisée en ce qu'elle comporte de la globine modifiée pour être soluble à pH physiologique,

28- Préparation selon la revendication 27, caractérisée en ce qu'elle est réalisée sous forme de tissu, de tricot, de treillis, d'éponge, ou de film
15 implantables, optionnellement renforcés par un matériau implantable suturable.

29- Préparation selon la revendication 27 ou 28, caractérisée en ce qu'elle comprend un autre matériau solide biocompatible, notamment de la cellulose oxydée,
20 du collagène ou du chitosan.

30- Préparation selon l'une des revendications 27 à 29 caractérisée en ce qu'elle comprend également un matériau solide insoluble à pH physiologique obtenu à partir de ladite globine.

25 31- Préparation selon l'une des revendications 27 à 29, caractérisée en ce qu'elle comprend également un autre matériau solide, à savoir de la globine biodégradable, stérile et insoluble à pH physiologique.

32- Préparation selon la revendication 16, caractérisée en ce que ledit matériau est insoluble à pH physiologique, ladite préparation étant formulée sous forme de poudre.

5 33- Préparation selon la revendication 32 caractérisée en ce qu'elle est réalisée sous forme de spray ou aérosol sec.

34- Préparation selon l'une des revendications 6 et 7, caractérisée en ce qu'elle est réalisée sous forme de
10 film, optionnellement renforcé par un matériau suturable.

35- Préparation selon l'une des revendications 7 et 8, caractérisée en ce qu'elle est réalisée sous forme d'implant solide obtenu par réticulation d'un gel ou d'une mousse de globine modifiée pour être soluble à pH
15 physiologique.

36- Préparation selon l'une des revendications 7 et 8, caractérisée en ce qu'elle comporte un agent fluidifiant et se présente sous forme de suspension, pâte ou gel.

20 37- Préparation selon la revendication 36, caractérisée en ce que ledit agent fluidifiant comprend de l'acide hyaluronique, de la carboxy méthylcellulose ou de la gélatine.

38- Préparation selon la revendication 36,
25 caractérisée en ce que ledit agent fluidifiant comprend de la globine modifiée pour être soluble à pH physiologique.

39- Préparation selon l'une des revendications 5 et

6, caractérisée en ce que ledit matériau est en solution sous forme de spray ou aérosol liquide.

40- Préparation selon l'une des revendications 5 et 6, caractérisée en ce que ledit matériau est en solution associée à un pansement.

41- Préparation selon l'une des revendications 5 et 6, caractérisée en ce que ledit matériau est en solution et comporte , de plus, un agent réticulant, pour former une colle adhésive sur les tissus organiques.

10 42- Préparation selon l'une des revendications 5 et 6, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme de mousse et comporte un agent réticulant pour former une colle adhésive sur les tissus organiques.

15 43- Préparation selon l'une des revendications 20 41 et 42, caractérisée en ce qu'elle comprend un agent adhésif, notamment l'acide hyaluronique ou la carboxy méthylcellulose.

20 44- Préparation selon l'une des revendications 5 et 6, caractérisée en ce qu'elle comprend, de plus un matériau solide et se présente sous forme d'éponge, de treillis, tissu, tricot, ou film, optionnellement renforcés par un matériau suturable.

25 45- Préparation selon la revendication 44, caractérisée en ce que ledit autre matériau est choisi dans le groupe formé par les celluloses oxydées , les collagènes et le chitosan.

46- Préparation selon la revendication 44, caractérisée en ce que ledit autre matériau est obtenu à

partir de globine modifiée pour être soluble à pH physiologique et rendu insoluble à pH physiologique.

47- Préparation selon la revendication 44, caractérisée en ce que ledit autre matériau comprend de la globine biodégradable, stérile, et insoluble à pH physiologique.

48- Préparation selon l'une des revendications 20, 21, 41 et 42, pour former une colle biologique, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme d'un kit comprenant, dans des réservoirs distincts, le matériau soluble à pH physiologique et l'agent réticulant.

49- Préparation selon l'une des revendications caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme de kit comprenant, dans des réservoirs distincts, ledit matériau susceptible d'être obtenu à partir de globine modifiée pour être soluble à pH physiologique et un autre matériau.

50- Préparation selon l'une des revendications 1 à 49, caractérisée en ce qu'elle est stérile.

51- Préparation selon la revendication 50, caractérisée en ce qu'au moins le matériau susceptible d'être obtenu à partir de globine modifiée pour être soluble à pH physiologique a été stérilisé par irradiation beta ou gamma, notamment entre 5 et 25 kGray, optionnellement sous forme congelée, optionnellement en présence de carboglace.

52- Préparation selon la revendication 51

caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un autre matériau qui a été stérilisé à la chaleur.

53- Préparation selon l'une des revendications 1 à 52, caractérisée en ce qu'elle comporte, en outre, un
5 matériau de colle à base de fibrinogène plasmatique.

54- Utilisation d'un matériau susceptible d'être obtenu à partir de globine modifiée, - notamment chimiquement, pour être soluble à pH physiologique, pour la réalisation d'une préparation selon l'une des
10 revendications 1 à 53 utilisable, notamment, pour la cicatrisation, protection ou comblement de plaies cutanées externes ou chirurgicales internes, le comblement des rides et défauts cutanés, le comblement des tissus conjonctifs ou sphincters pour des
15 applications en urologie : reflux vésico-urétéral de l'enfant, incontinence d'effort de la femme ; en O.R.L. : correction de volume des cordes vocales, la formation de bouchon adhésif et hémostatique pour les plaies tissulaires ou les plaies artérielles percutanées, ou
20 comme moyen de fixation de prothèses ou biomatériaux sur les tissus receveurs, notamment pour la fixation des dispositifs de renfort pariétal et viscéral, la réalisation de films, gels et membranes pour prévention des adhérences post opératoires, utilisés seuls ou en
25 association avec d'autres dispositifs médicaux, la cicatrisation du cartilage ou de l'os, ou l'association à des antibiotiques pour inhiber le développement bactérien.