



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2004/05/05
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2004/11/25
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2005/11/07
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2004/001082
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2004/100934
(30) Priorité/Priority: 2003/05/12 (0305700) FR

(51) Cl.Int./Int.Cl. *A61K 9/70* (2006.01),
A61L 15/00 (2006.01), *A61K 38/42* (2006.01)
(71) Demandeur/Applicant:
KHORIONYX, FR
(72) Inventeur/Inventor:
TAYOT, JEAN-LOUIS, FR
(74) Agent: ROBIC

(54) Titre : **IMPLANT INJECTABLE DE GLOBINE INSOLUBLE**
(54) Title: **INSOLUBLE GLOBIN INJECTABLE IMPLANT**

(57) **Abrégé/Abstract:**

L'invention a pour objet une préparation, injectable ou implantable dans l'organisme humain et animal, qui comporte, à titre de composant principal, de la globine insoluble au pH physiologique, biocompatible et stérile.



(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
25 novembre 2004 (25.11.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/100934 A1(51) Classification internationale des brevets⁷ : A61K 9/70,
A61L 15/00, A61K 38/42(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2004/001082

(22) Date de dépôt international : 5 mai 2004 (05.05.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0305700 12 mai 2003 (12.05.2003) FR(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : KHORI-
ONYX [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 : BERNASCONI, Jean etc.; Cabinet
LAVOIX, 2, Place d'Estienne d'Orves, F-75441 PARIS
(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, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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), eurasiatique (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, IT, LU, 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 :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

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: INSOLUBLE GLOBIN INJECTABLE IMPLANT

(54) Titre : IMPLANT INJECTABLE DE GLOBINE INSOLUBLE

(57) Abstract: The invention relates to a preparation which can be injected into or implanted in a human or animal organism, comprising as a main component insoluble globin which has a physiological pH and which is biocompatible and sterile.

(57) Abrégé : L'invention a pour objet une préparation, injectable ou implantable dans l'organisme humain et animal, qui comporte, à titre de composant principal, de la globine insoluble au pH physiologique, biocompatible et stérile.



WO 2004/100934 A1

Implant injectable de globine insoluble

La présente invention a pour but de fournir des préparations de globine utiles pour une administration à l'homme. Ces préparations peuvent se présenter, notamment, sous forme de pâtes injectables ou de matériaux solides implantables, ou d'implants.

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 forme d'implants divers. En fait, seul le collagène animal est généralement utilisé.

La préparation de collagène humain, qui serait préférable au collagène animal, est envisageable à 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 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 aussi très coûteuse, ce qui gênera certainement le développement commercial de ce produit.

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 tétrapyrole 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.

5 Contrairement à l'hémoglobine qui est parfaitement soluble à pH physiologique, la globine est remarquablement insoluble dans les mêmes conditions. Le caractère insoluble de la globine dans des conditions physiologiques a gêné jusqu'à présent le développement de ses applications pharmaceutiques. C'est pourquoi la plupart des essais 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, ce qui augmente la charge négative de la globine et diminue son pH isoélectrique. 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. 10 (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 n'est pas l'élément actif, ni l'élément principal de ce produit.

25 La présente invention se propose de fournir de nouveaux matériaux et préparations injectables ou implantables dans l'organisme, dont la globine est l'élément actif principal et qui ne présentent pas les inconvénients des matériaux et formulations connus, par exemple de collagène ou autres.

30 L'invention a pour objet une préparation pâteuse ou solide de globine insoluble au pH physiologique, biocompatible, stérile et, de préférence, biodégradable, notamment sous forme de pâte injectable, de matériaux

solides, par exemple de granules, de films, ou d'implants insolubles.

La présente invention se propose de conserver le caractère insoluble, naturel à pH neutre, de la globine, par exemple en récoltant par centrifugation un précipité protéique de globine formé par suspension de ce précipité dans un véhicule pharmaceutiquement acceptable, par exemple une solution aqueuse physiologique de type PBS, contenant 9g/l NaCl et tamponnée à pH neutre entre 6.8 et 7.5. La pâte ainsi formée est injectable après homogénéisation à l'aide d'une fine aiguille. Cette pâte peut être préparée en présence d'agents visqueux et lubrifiants comme des solutions de triglycérides, de polyéthylène-glycol, de hyaluronate, notamment de sodium, d'acide hyaluronique ou d'autres polysaccharides ou mucopolysaccharides ou de cellulose oxydée. Un tel additif facilite le passage du précipité pâteux à travers les plus fines aiguilles (diamètre 30g) et son injection comme implant intradermique.

L'originalité et l'intérêt de ce produit résident dans le fait qu'il s'agit d'une pâte protéique, parfaitement biocompatible avec les tissus environnants dans lesquels elle est injectée. Cette protéine n'a subi aucune altération ni modification chimique, elle est naturellement insoluble dès qu'elle se trouve dans un environnement physiologique. Une pâte protéique de globine humaine peut être utilisée chez l'homme pour combler des cavités, des rides, des cicatrices cutanées ou augmenter le volume de certains tissus (sphincters urinaires, digestifs, cordes vocales etc...). Cette pâte peut être utilisée pour combler des défauts de l'os ou du cartilage et pour en faciliter la cicatrisation. Des particules de globine insoluble peuvent aussi être utilisées en culture de cellules animales ou humaines. Les cellules de charge

électrique négative s'attachent à la surface des particules de globine chargées positivement et se multiplient à leur surface. La dégradation progressive du support de globine, au contact des cellules qui le digèrent progressivement, peut fournir en plus un moyen de nutrition des cellules complémentaire ou alternatif aux milieux de culture liquides utilisés jusqu'ici.

Les applications de comblement permises par cette pâte de globine sont donc nombreuses et inattendues pour cette protéine.

La globine humaine homologue est préférable et permet d'éviter toute réaction immunologique du patient à traiter, pendant ou après l'injection. Ce produit représente donc un avantage important par rapport au collagène qui jusqu'à présent est préparé à partir de 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
- Impossibilité de traiter les personnes allergiques

La globine reste cependant soluble à des pH acides ou basiques et dans ces conditions peut être filtrée stérilement sur des membranes poreuses. Pour des concentrations appropriées de 20 à 300 mg/ml, de telles solutions peuvent être traitées comme des solutions de protéines et permettent de réaliser des produits tels que : éponges, films, granules, en utilisant ou combinant les techniques de séchage, lyophilisation, réticulation, précipitation. Quelques exemples sont développés ci-dessous.

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 suffisante à

partir des dons périmés restant en stock dans les centres de transfusion sanguine et pour lesquels tous les tests préalables sanitaires ont été réalisés au moment du prélèvement. La préparation de globine insoluble, injectable ou d'autres biomatériaux à base de globine représente donc de nouvelles applications biomédicales permettant de valoriser le sang non utilisé ou les dons de sang périmé et d'éviter ou de diminuer leur destruction.

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 5 à 100 ml, et sa transformation en globine autologue avec les mêmes méthodes que pour de grands volumes, puis l'injection de la pâte obtenue pour la correction des rides du même patient ou d'autres applications telles que la cicatrisation des plaies chroniques. Le nombre de seringues préparées à partir d'un prélèvement du patient peut être important et permettre le traitement du patient pendant plusieurs années.

De même le placenta humain qui est expulsé après l'accouchement contient du sang qui est généralement 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 examens biochimiques, 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 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 nécessite d'abord de recueillir et purifier les globules rouges dans ces échantillons de sang, ou liquides sanguins, par des opérations simples et déjà connues. Les globules rouges
5 sont récupérés par centrifugation à basse vitesse. Le surnageant plasmatique 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
10 globules rouges est ainsi débarrassée des protéines du plasma. Le culot de globules rouges purifiés est 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
15 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
20 d'hémoglobine purifiée et stérile, dépourvue de particules et dérivés d'origine tissulaire, cellulaire ou membranaire.

Le clivage Hème-Globine à pH acide a été décrit en présence d'alcool par SCHULZ dès 1898. ANSON et MIRSKY en
25 1930 puis ROSSI-FANELLI et coll. en 1958 utilisent l'acétone en présence d'acide à 0°C. TEALE (1957) 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
30 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.

Des essais de solubilisation à pH neutre 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 réalisés par VOLCKMANN en 1988 par succinylation.

Le caractère insoluble en milieu physiologique explique la persistance de la globine après implantation tissulaire, ce qui la rend aussi 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.

Au contraire, la plupart des autres protéines ne sont précipitables que par des concentrations élevées de sels ou d'alcool, ce qui rendrait leurs précipités non biocompatibles et non utilisables pour des injections intra tissulaires. De plus, de tels implants disparaîtraient très vite par diffusion des agents précipitants et dissolution progressive du précipité au contact du milieu physiologique des tissus.

La vérification de l'intérêt de l'invention peut être facilement réalisée à partir d'une préparation de globine de lapin. La pâte de globine précipitée, physiologique, ainsi préparée peut être injectée par voie sous-cutanée en différents endroits sur le dos ou la paroi du lapin. Il est facile de vérifier l'innocuité par l'absence d'érythème localement. La persistance du produit sous la peau peut être observée par palpation en fonction du temps. L'absence de pouvoir antigénique du produit peut être vérifiée par immunisation de lapins avec ou sans adjuvant 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.

Exemples de réalisation de produits selon l'invention.

5 Exemple 1 : Préparation de globine de lapin

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 coagulation. On obtient ainsi 210 ml de sang qui sont
10 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 final, lavé, est additionné, sous agitation, d'un volume égal
15 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
20 d'hémoglobine.

L'hémoglobine est transformée en globine selon la 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
25 est ajusté à 3. La concentration finale est de 74% d'éthanol et de 22g/l d'hémoglobine à pH acide. On ajoute 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
30 minutes pour éliminer le charbon sous forme de culot. Le surnageant contenant la globine acide décolorée est filtré sur une série de membranes poreuses jusqu'à la porosité la

plus faible (0.2 micron) pour éliminer les particules fines de charbon. Le filtrat est dilué par un volume égal d'eau distillée, le pH est ajusté à 7.4 par addition de NaOH et la globine précipite massivement. Après 15 heures, le précipité de globine est récupéré par centrifugation, puis lavé 2 fois par 3 volumes de solution physiologique PBS, contenant 9g/l NaCl et tamponnée à pH 7.4. On récolte 58,2 g de précipité de globine à pH 7.4. Le précipité est homogénéisé par transferts successifs entre 2 seringues de volume 5 ml reliées par un connecteur de diamètre intérieur de 1 à 0,2 mm, en appuyant successivement sur le piston de chaque seringue pour faire passer le précipité dans l'autre seringue.

En final, le précipité homogénéisé est réparti dans des seringues de 1 ml. Il est possible d'expulser la pâte de globine précipitée à partir de la seringue, à travers des aiguilles fines de diamètre 24 ou 27g. La concentration de globine dans la pâte peut être ajustée à des valeurs comprises entre 30 et 150 mg/g.

Exemple 2 : Préparation de globine humaine

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 12 000t/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.

Un volume égal de 210 ml d'HCl 0.1 N à 4°C est ajouté puis l'ensemble est versé dans 4 l d'acétone, contenant 40 ml d'HCl 1 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 est récupéré, lavé en acétone acide et séché sous courant d'air.

En variante, divers acides minéraux (sulfurique, phosphorique...) ou carboxyliques, tels que l'acide acétique, l'acide oxalique, ou l'acide citrique par exemple, peuvent être utilisés à la place de l'acide chlorhydrique pour acidifier 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. 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.

La globine est remise en solution aqueuse à pH compris entre 2 et 3. La solution aqueuse de globine acide est filtrée stérilement sur membrane de porosité 0.2 micron, puis précipitée par neutralisation du pH par addition de NaOH jusqu'à pH 7.4. Des seringues de pâte de globine, précipitée à pH neutre, peuvent être préparées comme dans l'exemple précédent. L'opération de neutralisation de la solution de globine acide peut s'effectuer en ajoutant du hyaluronate de sodium à pH

alcalin. Dans ce cas il se forme une pâte de globine insoluble complexée et imprégnée par le hyaluronate, apportant une fonction lubrifiante qui améliore le caractère injectable à travers de très fines aiguilles
5 (diamètre 30g).

Exemple 3 : Autre préparation de globine humaine

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 des seringues
10 contenant une pâte de globine humaine, précipitée, biocompatible et implantable par injection.

Exemple 4 : Préparation de globine humaine ayant subi un traitement alcalin par la soude 0.1 ou 1 M pendant 1 heure à 20 °C

On réalise le procédé de l'exemple 1 ou 2 jusqu'à
15 l'obtention du précipité de globine à pH 7.4, avant lavages. Ce précipité est dissout, à nouveau, dans 3 volumes de soude NaOH 0.1 M à 1M à 20°C pendant 1 heure, sous agitation.

La solution est ensuite neutralisée par addition d'un
20 volume égal d'HCl de la même molarité et le pH de la suspension est ajusté entre 7 et 7.4. Le précipité de globine est alors récolté par centrifugation, puis lavé en solution physiologique PBS comme dans les exemples précédents. La pâte de globine précipitée, pouvant être
25 additionnée d'acide hyaluronique, ou d'autres produits visqueux et lubrifiants biocompatibles :triglycérides, polyéthylène glycol, cellulose oxydée, chitosane,etc... est répartie en seringues et on vérifie à nouveau le caractère injectable du produit obtenu à travers de très fines
30 aiguilles pour usage intradermique. Ce traitement alcalin de la globine permet d'améliorer les garanties de sécurité sanitaire du produit sans modifier de manière

significative le caractère insoluble de la globine à pH neutre.

Exemple 5 : Préparation d'une pâte de globine précipitée et réticulée par le glutaraldéhyde.

5 Ce traitement est possible pour augmenter le temps de
résorption de l'implant. Le précipité final de globine est
mis en suspension à 2% dans du PBS. Le glutaraldéhyde est
ajouté sous agitation à une concentration de 1 mg/g de
précipité. Après incubation de 1 heure à 20° C, le
10 précipité de globine est lavé et mis en seringue comme
dans les exemples précédents.

D'autres agents de réticulation comme des dialdéhydes
ou des polyaldéhydes peuvent être utilisés, notamment des
polysaccharides oxydés par l'acide périodique tels que le
15 dextran oxydé, l'amidon oxydé, ou l'acide hyaluronique
oxydé.

**Exemple 6 : Préparation de seringues de pâte de globine précipitée
stérile**

Pour préparer des seringues stériles, il est
20 nécessaire de travailler dans des conditions aseptiques
aussitôt la filtration stérilisante de la solution de
globine acide sur membrane de porosité 0.2 micron. Ceci
peut se faire sous hotte à flux laminaire dans une zone
stérile de classe 100 ou 1000, ou avec une enceinte
25 stérile, accessible de l'extérieur par des gants souples
de latex. Les opérations de précipitation, de décantation,
ou de centrifugation du précipité doivent s'effectuer dans
des pots stérilisés et emballés sous film protecteur.

Une autre méthode consiste à répartir une solution
30 acide de globine soluble, filtrée stérilement dans une
première seringue et une deuxième solution alcaline,
filtrée stérilement dans une deuxième seringue. Le pH de

chaque seringue est ajusté de manière que leur mélange ultérieur soit à pH neutre. La connexion de ces deux seringues, grâce à un connecteur stérile permet de réaliser un mélange stérile, homogène, de pH neutre, par des transferts successifs d'une seringue dans l'autre. Un précipité stérile est obtenu par précipitation spontanée de la globine. La suspension obtenue peut être concentrée par extrusion à travers de fines aiguilles qui ne laissent passer que la phase aqueuse. L'addition éventuelle de hyaluronate de sodium ou de tout autre agent visqueux et lubrifiant dans la seringue de globine concentrée permet de l'incorporer dans la globine finale. En variante, il est possible d'incorporer aussi un agent de réticulation, au moment du mélange des deux seringues initiales, pour allonger le temps de résorption in vivo de la globine.

Exemple 7 : Stérilisation finale des seringues de pâte de globine précipitée

Une stérilisation des seringues préparées selon l'un quelconque des exemples précédents peut être réalisée par irradiation à une dose comprise entre 5 et 30 kilogray. Les diverses préparations de globine sont insolubles avant comme après leur stérilisation par irradiation. Dans les deux cas, la globine insoluble à pH neutre devient soluble si l'on opère une acidification à pH 3 par toute solution aqueuse acide.

Exemple 8 : Réalisation d'un gel ou d'un film insoluble à partir de globine soluble non modifiée.

Une solution de globine soluble est réalisée en dissolvant la poudre acétonique de globine à pH 3, à une concentration de 20 à 120 mg/ml en solution aqueuse. Cette solution est filtrée stérilement sur membrane de porosité

0,2 μ , puis ajustée à pH 5 par addition de soude stérile NaOH 1 N sous agitation.

Le mélange est additionné d'amidon oxydé à pH 3,5, ou d'un autre aldéhyde, ou polyaldéhyde réticulant, contenant
5 au moins 5 atomes de carbone par molécule, à une concentration de 0,5% sous agitation pendant 5 mn. Le mélange stérile est coulé sur une surface plane pour obtenir une épaisseur de 1 à 3 mm de liquide, à une température de 20 à 37°C, sous flux laminaire.

10 Le produit liquide se gélifie progressivement grâce à la réticulation des chaînes de globine induite par l'amidon oxydé, puis se déshydrate sous le courant d'air, si on souhaite obtenir un film.

Le film final d'épaisseur comprise entre 20 et 200 μ ,
15 selon la concentration initiale de matière, peut être stérilisé par irradiation bêta ou gamma ou par l'oxyde d'éthylène. Des agents de filmage bien connus peuvent être ajoutés tels que le collagène, la gélatine, l'acide hyaluronique, la cellulose oxydée ou d'autres
20 polysaccharides ou mucopolysaccharides, le polyéthylène-glycol, le glycérol etc. Un tel additif permet de donner de la souplesse et/ou de la résistance au film. Un tel film peut être utilisé seul pour protéger une plaie cutanée ou chirurgicale, favoriser la cicatrisation, ou
25 peut être associé à diverses prothèses (prothèses vasculaires, treillis de renfort, matrices poreuses) pour les rendre imperméables, ou améliorer leur biocompatibilité, ou conférer des propriétés anti-adhérences ou un caractère adhésif, ou accélérer la
30 colonisation cellulaire de ces prothèses, selon des techniques connues et déjà employées avec d'autres produits.

Dans une variante, il est possible de réaliser un film à partir de globine soluble à pH 5 comme

précédemment, mais sans introduire d'agent de réticulation. La réticulation finale du film séché est réalisée par l'irradiation finale qui crée des liens covalents entre les chaînes de globine. Un tel film peut
5 être collé ensuite sur les tissus à l'aide d'adhésifs biologiquement compatibles, réactifs avec les groupements aminés de la globine. De préférence les polyaldéhydes obtenus par oxydation périodique de polysaccharides sont utilisables. A titre d'exemple le dextrane oxydé ou
10 l'amidon oxydé sont préférés.

Exemple 9: Applications biomédicales des particules de globine insolubles comme support de cultures cellulaires.

La pâte de précipité de globine à pH neutre, stérile,
15 obtenue comme dans l'un quelconque des exemples précédents, est incubée par exemple avec du milieu DMEM pour cultures cellulaires, à une température voisine de 37°C. On obtient une suspension dans laquelle les cellules sont introduites à une densité de 10000 à 100000
20 cellules/ml. Après agitation de 30 minutes et décantation de 1 heure à 15 heures, les cellules s'attachent aux particules de globine et se multiplient à leur surface pendant la durée de la culture qui peut être de 3 à 12 jours. Le milieu de culture cellulaire est choisi en
25 fonction du type cellulaire selon les connaissances actuellement publiées.

En fin de multiplication, la suspension cellulaire fixée aux particules de globine, peut être concentrée par décantation spontanée. La pâte cellulaire obtenue peut
30 être mise en seringues et injectée comme implant cellularisé biocompatible pour des applications thérapeutiques diverses aujourd'hui connues.

La culture de fibroblastes cutanés, selon cette méthode, peut permettre la préparation d'implants

cellularisés pour des applications de cicatrisation cutanée ou de comblement de tissus conjonctifs.

La culture de chondrocytes, selon cette méthode, peut permettre la préparation d'implants cellularisés pour des applications de comblement et cicatrisation de plaies superficielles du cartilage.

La culture d'ostéoblastes, selon cette méthode, peut permettre la préparation d'implants cellularisés pour des applications de comblement et cicatrisation de fractures ou pertes de substance osseuse.

De la même manière des cellules souches, notamment d'origine embryonnaire, ou de sang de cordon ombilical, ou de moelle osseuse, ou isolées à partir de différents tissus adultes, peuvent être cultivées sur ces particules de globine et remplir les fonctions recherchées après injection ou implantation de la pâte cellularisée.

Pour des applications biomédicales comme la fabrication de virus ou des vaccins dérivés, dans lesquelles les cellules peuvent être séparées, après culture, de leur support de globine, les méthodes traditionnelles de trypsination peuvent être employées. Les particules non dégradées de globine décantent spontanément au fond du flacon et peuvent être séparées des cellules par décantation.

Dans certaines variantes, il est possible de remplacer les particules de globine par des films contenant la globine insoluble. La culture des cellules peut alors s'effectuer par circulation continue du milieu de culture au contact de ces films plans, comme pour toutes cultures de cellules sur membranes ou films aujourd'hui connues. Cette méthode permet de réaliser également des films cellularisés qui peuvent être implantés pour des applications médicales spécifiques.

Exemple 10: Applications médicales des implants de globine insoluble injectable.

5 Les préparations selon l'invention, et notamment les seringues de globine insoluble préparées selon l'un quelconque des exemples 1 à 7 peuvent être utilisées dans les applications suivantes non limitatives :

- Comblement des rides et défauts cutanés
- 10 - Comblement des tissus conjonctifs ou sphincters pour des 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.
- Bouchon hémostatique pour les plaies artérielles
- 15 - Cicatrisation cutanée, par utilisation de la pâte de globine seule ou en association avec d'autres produits de cicatrisation ou facteurs de croissance.
- Cicatrisation du cartilage ou de l'os, par
- 20 utilisation de la globine seule ou en association avec d'autres produits de cicatrisation : phosphate de calcium, carbonate de calcium, hydroxyapatite, facteurs de croissance de type BMP.
- Association à des antibiotiques pour inhiber le
- 25 développement bactérien, pendant la période de colonisation et dégradation de l'implant.

L'invention a également pour objet les procédés de traitement du corps humain ou animal comprenant au moins

30 une étape d'administration d'une quantité thérapeutiquement efficace d'une préparation injectable ou implantable selon l'invention à un patient qui en présente le besoin.

Ces procédés comprennent notamment les administrations correspondant aux applications précitées, par les voies parentérales ou chirurgicales d'injection ou d'implantation, ou par voie cutanée.

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. – ORTMAYER D.W. – OTT D.L. – JACKSON R.L. (1953)

- 15 Comparison of Globin Insulin and NPH Insulin
Diabetes, 2, 5, p.365-369

RABINOWITCH I.M. – FOWLER A.F. – BENSLEY E.H. – GORDON A.L. – MOUNTFORD M. (1947)

- 20 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)

- 30 Insulin preparations with prolonged activity
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
J. Lab.and Clin. Med. 40, 2, 211-222

20

TAYOT J.L. – VERON J.L. (1983)

Brevet Institut Mérieux : FR 8311324
Process for preparing globin from haemoglobin and globin
obtained by this process.

25 US Patent 4543209 (1985)

TEALE F.W.J. (1957)

Cleavage of the haem-protein link by acid methyl-ethyl
keton

30 Biochem. Biophys. Acta 26, 437.

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 injectable ou implantable dans l'organisme humain et animal caractérisée en ce qu'elle comporte, à titre de composant principal, de la globine insoluble au pH physiologique, biocompatible et stérile.
5
2. Préparation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la globine est une globine d'origine humaine.
3. Préparation selon l'une des revendications 1 et 2 caractérisée en ce que la globine, dans la préparation, est à l'état précipité.
10
4. Préparation injectable biocompatible selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisée en ce qu'elle comporte de la globine homogénéisée.
5. Préparation selon la revendication 4, caractérisée en ce que la globine se présente sous forme d'une pâte homogénéisée, injectable.
15
6. Préparation selon l'une des revendications 4 et 5 caractérisée en ce que la pâte homogénéisée est injectable à travers une aiguille hypodermique.
20
7. Préparation selon l'une des revendications 4 à 6 caractérisée en ce que la concentration de globine dans la préparation injectable est comprise entre 30 et 150 mg/g
8. Préparation selon l'une des revendications 4 à 7 caractérisée en ce que le pH de la préparation est compris entre 6 et 8.
25
9. Préparation selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisée en ce que la globine est en suspension.
10. Préparation selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce que la globine est en solution, à un pH inférieur à 6 ou supérieur à 8 dans un véhicule liquide pharmaceutiquement acceptable.
30
11. Préparation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la globine est présente dans la

préparation sous forme d'un gel.

12. Préparation selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 caractérisée en ce qu'elle comprend, en outre, un agent lubrifiant.

5 13. Préparation selon la revendication 12 caractérisée en ce que cet agent lubrifiant est choisi parmi des solutions de triglycérides, de polyéthylène glycol, de hyaluronate, d'acide hyaluronique, de cellulose oxydée, ou de polysaccharides ou de mucopolysaccharides.

10 14. Préparation selon l'une des revendications 1 à 13 caractérisée en ce que la préparation comporte un agent réticulant.

15 15. Préparation selon la revendication 14 caractérisée en ce que l'agent réticulant est choisi parmi le glutaraldéhyde, les dialdéhydes et les polyaldéhydes, notamment les polysaccharides oxydés par l'acide périodique, y compris le dextran oxydé, l'amidon oxydé ou l'acide hyaluronique oxydé.

20 16. Préparation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle comporte ou est constituée par un film de globine, la préparation pouvant contenir optionnellement, un agent de filmage notamment tel que collagène, gélatine, acide hyaluronique, cellulose oxydée, polyéthylène glycol, glycérol.

25 17. Préparation selon la revendication 16 caractérisée en ce que le film a été obtenu par déshydratation d'un gel ou d'une solution.

30 18. Préparation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle est réalisée sous forme d'un implant solide.

19. Préparation selon l'une des revendications 15 à 18, caractérisée en ce qu'elle est réticulée.

20. Préparation selon la revendication 19 caractérisée en ce qu'elle est réticulée par adjonction

d'un agent réticulant et/ou par une irradiation.

21. Préparation selon l'une des revendications 1 à 20, caractérisée en ce qu'elle contient, en outre, l'un au moins des principes actifs suivants : produit de cicatrisation, facteur de croissance, antibiotique.

22. Préparation selon l'une des revendications 1 à 21, caractérisée en ce qu'elle contient des cellules, notamment des cellules cultivées en utilisant la globine de la préparation comme support de culture, avant injection ou implantation, cellules pouvant être notamment des fibroblastes cutanées, des chondrocytes, des ostéoblastes, ou des cellules souches.

23. Utilisation d'une préparation selon l'une des revendications 1 à 22 pour la réalisation d'un matériau de comblement tissulaire.

24. Utilisation selon la revendication 23 pour le comblement de cavités, rides ou cicatrices cutanées et cavités et fractures de l'os ou du cartilage.

25. Utilisation d'une préparation selon l'une des revendications 1 à 22 pour l'augmentation de volume de tissus.

26. Utilisation selon la revendication 25 caractérisée en ce qu'elle est prévue pour l'augmentation de sphincters, notamment urinaire ou digestif ou de cordes vocales.

27. Utilisation d'une préparation selon l'une des revendications 16 à 22 pour la réalisation de films et/ou de compresses pour la protection et/ou la séparation de plaies ou cicatrices externes ou internes, chirurgicales ou non.

28. Utilisation d'une préparation selon l'une des revendications 1 à 22 pour la réalisation d'un matériau destiné à former un bouchon hémostatique pour plaies artérielles percutanées, ou une pâte de cicatrisation

cutanée, un matériau de cicatrisation du cartilage ou de l'os.