

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

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

2 650 508

(21) N° d'enregistrement national :

89 10355

(51) Int Cl^E : A 61 L 25/00; A 61 K 37/02.

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 1^{er} août 1989.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : FONDATION NATIONALE DE TRANS-FUSION SANGUINE. — FR.

(72) Inventeur(s) : Marion Steinbuch ; Jacques Chabat.

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : BOPI « Brevets » n° 6 du 8 février 1991.

(60) Références à d'autres documents nationaux appartenants :

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : Cabinet Regimbeau, Martin, Schrimpf, Warcoin et Ahner.

(54) Colle pasteurisée pour réunir des tissus humain ou animal.

(57) La présente invention concerne une colle pour réunir des tissus humain ou animal du type comportant deux composants :

a/ un mélange de protéines extraites du plasma humain contenant principalement du fibrinogène et du facteur XIII et b/ de la thrombine calcique; mélangés extemporanément au moment du collage, caractérisée en ce que le mélange de protéines contenant principalement du fibrinogène et du facteur XIII; est obtenu à partir d'un cryoprecipité de plasma humain mis en solution et précipité en présence d'héparine et en ce que le précipité remis en solution subit au moins une étape de pasteurisation en présence d'un monosaccharide et d'un sucre alcoolique.

FR 2 650 508 - A1

D

La présente invention se rapporte à une colle pasteurisée pour réunir des tissus humain ou animal.

Il est depuis longtemps connu d'utiliser des substances favorisant la coagulation du sang pour stopper des hémorragies ou 5 cicatriser des blessures.

Dans les premières propositions qui ont été faites dans ce domaine, on a tout d'abord utilisé des tampons ou des plaquettes de fibrine puis, par la suite on a réalisé des collages de tissus à l'aide de plasma sanguin.

10 Ce type de colle est de façon générale un concentré de facteurs de l'hémostase coagulable par la thrombine riche en fibrinogène.

Elle est constituée de deux composants essentiels qui sont mélangés extemporanément lors de l'utilisation. Le premier composant est constitué d'un mélange de protéines extraites du plasma humain : 15 fibrinogène, fibronectine, et facteurs XIII (ou facteurs stabilisateurs de la fibrine). Le deuxième composant est constitué de thrombine calcique qui peut être d'origine animale, bovine par exemple.

Afin d'éviter tout risque de contamination virale lors de l'application de cette colle, il est nécessaire d'effectuer, au cours de sa 20 préparation, une étape d'inactivation virale du premier composant à base de protéines d'origine plasmatique. La pasteurisation qui est une méthode appropriée pour ce type d'opération pose en fait des problèmes en raison de l'instabilité thermique de certaines protéines présentes dans ce premier composant.

25 Le but de la présente invention est de proposer une nouvelle colle pasteurisée essentiellement caractérisée par le procédé d'obtention du premier composant extrait du plasma humain, ce procédé incluant une étape d'inactivation virale.

Plus particulièrement, la présente invention se rapporte à une 30 colle pour réunir les tissus humain ou animal de type comportant deux composants :

a) un mélange de protéines extraites du plasma humain contenant principalement du fibrinogène et du facteur XIII et,
b) de la thrombine calcique,
mélangés extemporanément au moment du collage, caractérisée en ce que le mélange de protéines contenant principalement du fibrinogène et du facteur XIII est obtenu à partir d'un cryoprécipité de plasma humain mis en solution et précipité en présence d'héparine et en ce que le précipité remis en solution subit au moins une étape de pasteurisation en présence d'un monosaccharide et d'un sucre alcoolique.

10 Les inventeurs ont en effet mis en évidence que la présence d'un monosaccharide et d'un sucre alcoolique, lors de la pasteurisation de la solution protéique, permet de stabiliser lesdites protéines et par conséquent de préserver leurs activités biologiques.

15 Les concentrations en monosaccharide et sucre alcoolique utilisées pour stabiliser les protéines dépendent, bien entendu, de la nature, la concentration des protéines dans la solution protéique et de la nature même du monosaccharide et du sucre alcoolique utilisés et sont en général de 1000 et 1400 g pour le monosaccharide et entre 200 et 400 g pour le sucre alcoolique rajoutés par litre de solution protéique.

20 Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, on utilise de préférence le glucose comme monosaccharide et le sorbitol comme sucre alcoolique à des concentrations de 1 200 g pour le glucose et de l'ordre de 300 g pour le sorbitol rajoutés par litre de solution protéique.

25 Selon l'invention, on pasteurise la solution protéique à une température voisine de 60°C pendant environ 10 heures ou dans des conditions de pasteurisation équivalentes, c'est-à-dire des températures et des durées de traitement suffisantes pour permettre de neutraliser toute trace de virus présent dans le produit, en particulier le virus de l'hépatite.

Cette pasteurisation sera effectuée dans des conditions proches des conditions physiologiques afin de ne pas perturber les protéines. Le pH utilisé sera ainsi de préférence proche de 8.

La description détaillée d'un mode de réalisation de l'invention, donnée ci-dessous à titre non limitatif permettra de mettre en évidence d'autres caractéristiques de l'invention.

Le cryoprécipité est obtenu par des techniques connues à partir de plasma humain décongelé à une température de 0 à 4°C, puis centrifugé. Le cryoprécipité est ensuite remis en solution dans un tampon Tris à pH 7. La concentration en protéines est alors de 15 à 35 g/l.

Le mélange de protéines est précipité de la solution obtenue par l'héparine. On utilisera de préférence de 10 à 40 U/ml d'héparine et une température de 10 à 35°C.

Le précipité obtenu est alors récupéré par centrifugation et le surnageant éliminé.

Le précipité obtenu est ensuite solubilisé dans un tampon à pH 8 contenant des agents stabilisants en particulier des amino acides tels que glycine et arginine ainsi que des inhibiteurs de la fibrinolyse tels que l'acide ϵ -aminocaproïque et l'aprotininine (inhibiteur de la plasmine). La concentration protéique de la solution est dans ce cas de 40 à 70 g/l. A ce stade, il est possible d'envisager une étape de filtration clarifiante pour éliminer les insolubles.

Ce n'est donc qu'au moment de l'étape de pasteurisation que les stabilisants de pasteurisation à proprement dits, c'est-à-dire le monosaccharide et le sucre alcoolique, sont introduits. La solution protéique contenant ces stabilisants est alors chauffée à une température voisine de 60°C pendant environ 10 heures.

Afin d'éliminer les stabilisants après le traitement d'inactivation virale et de concentrer les protéines, on pourra utiliser des méthodes usuelles de type précipitation, dialyse ou filtration par exemple.

Ainsi, la solution pasteurisée pourra être diluée dans un tampon à un pH situé entre 6 et 7 contenant du NaCl 0,015 M - citrate

trisodique sur 5mM acide ϵ -aminocaproïque 25 mM et arginine 17 mM. La solution diluée dans un rapport 1/5 à 1/10 (V/V) est refroidie à une température comprise entre -1° et -5°. Les protéines sont précipitées par addition d'alcool à 10 % final en maintenant une température inférieure à 5 -1°C et supérieure à -5°C, le précipité récupéré après centrifugation et le surnageant éliminé.

Le culot de centrifugation est ensuite remis en solution avec 10 un tampon à pH 7,5 contenant du NaCl 0,06 M - citrate trisodique 1 mM - glycine 60 mM - acide ϵ -aminocaproïque 20 mM et arginine 20 mM. La solution obtenue est dialysée contre le même tampon puis concentrée pour atteindre une concentration protéique de 30 à 40 g/l.

A ce stade, il peut être rajouté des agents favorisant la solubilité du produit après lyophilisation tels que du polysorbate et/ou caprylate de sodium. La solution est alors filtrée stérilement à l'aide de 15 filtres ayant une porosité de 0,2 µm répartie en flacons puis lyophilisée.

Le lyophilisat peut être repris avec une solution d'eau PPI pouvant contenir un inhibiteur de la plasmine (aprotinine par exemple). La solution obtenue doit contenir au minimum une concentration de fibrinogène de 70 g/l.

20 Le produit reconstitué contient du fibrinogène, de la fibronectine dans les proportions suivantes : respectivement 65 à 85 % et 7 à 14 % rapportées aux protéines totales. Il contient également du FXIII ainsi que de l'héparine (50 à 200 U/ml).

25 L'exemple donné ci-dessous à titre non limitatif permettra de mettre en évidence d'autres caractéristiques de la présente invention.

EXEMPLE 1 :

A partir de 280 l de plasma, la cryoprécipitation a permis de récupérer 2 kg de précipité (cryoprécipité). Les protéines entrant dans la composition de la colle sont obtenues après remise en solution de ce précipité (1 kg/4 litres) dans un tampon tris 20 mM pH 7, suivi d'une précipitation à la température de 25°C après addition d'héparine à 32 U/ml. La suspension obtenue est centrifugée, le culot (environ 1 kg) est récupéré puis remis en solution dans du citrate trisodique 70 mM -glycine 0,1 M -NaCl 0,03 M - acide \mathcal{E} aminocaproïque 50 mM - arginine 50 mM et aprotinine 100 U/ml à pH 8 (1 kg/1 litre). On procède alors à un chauffage liquide 10 heures à 60°C après avoir ajouté des stabilisants de protéines, à savoir 2400 g de glucose et 600 g de sorbitol à 2 litres de solution pour un volume final d'environ 4 litres (compte tenu de la dilution due à l'addition des sucres). Après pasteurisation la solution est diluée 10 fois dans du citrate 5 mM-NaCl 0,051 M - acide \mathcal{E} aminocaproïque 25 mM - arginine 17 mM pH 7. La solution obtenue est alors précipitée à l'alcool à 10% final à une température comprise entre -2 et -3°C. Les protéines précipitées sont récupérées dans le culot de centrifugation. Celui-ci est ensuite remis en solution dans du citrate trisodique 1 mM - NaCl 60 mM - acide \mathcal{E} aminocaproïque 20 mM - glycine 60 mM pH 7,5.

Les protéines sont ensuite concentrées jusqu'à un taux de 27 - 30 g/l pour un volume final de 1,5 l. Le produit est ensuite réparti en flacons après filtration stérilisante puis lyophilise. La concentration en protéines coagulables peut être modulée en fonction du volume de reconstitution du lyophilisat. Le produit obtenu présente, pour un taux de protéines de 110 g/l, 77 g/l de fibrinogène coagulable, 12 g/l de fibronectine et un taux d'aprotinine de 2 000 KIU/ml (solvant utilisé pour la reconstitution du lyophilisat).

REVENDICATIONS

1. Colle pour réunir des tissus humain ou animal du type
5 comportant deux composants :
 - a) un mélange de protéines extraites du plasma humain contenant principalement du fibrinogène et du facteur XIII et,
 - b) de la thrombine calcique,
mélangés extemporanément au moment du collage, caractérisée en ce que
10 le mélange de protéines contenant principalement du fibrinogène et du facteur XIII est obtenu à partir d'un cryoprecipité de plasma humain mis en solution et précipité en présence d'héparine et en ce que le précipité remis en solution subit au moins une étape de pasteurisation en présence d'un monosaccharide et d'un sucre alcoolique.
- 15 2. Colle selon la revendication 1, caractérisée en ce que la pasteurisation est conduite en présence de glucose et de sorbitol.
3. Colle selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que la pasteurisation est réalisée à 60°C pendant 10 heures ou dans des conditions de pasteurisation équivalentes.
- 20 4. Colle selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la quantité de monosaccharide utilisée est comprise entre 1000 et 1400 g à ajouter par litre de solution et la quantité de sucre alcoolique entre 200 et 400 g à ajouter par litre de solution.
- 25 5. Colle selon la revendication 4, caractérisée en ce que les quantités de glucose et de sorbitol à ajouter par litre de solution sont respectivement de 1200 g et de 300 g .
6. Colle selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la précipitation en présence d'héparine est effectuée à une température de l'ordre de 10 à 35°C.
- 30 7. Colle selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'étape de pasteurisation est conduite à des concentrations de 40 à 70 g/l de protéines.

8. Colle selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le précipité avant pasteurisation contient d'autres agents stabilisants et des inhibiteurs de la fibrinolyse.

5 9. Colle selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'après pasteurisation les protéines sont lyophilisées.

10

15

20

25

30