RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication : **2 515 684**
(A n'utiliser que pour les commandes de reproduction).

A1

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

(21) **N° 82 18223**

(54) **Nouveau dérivé d'un activateur de plasminogène non-immunogène d'origine humaine.**

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). **C 12 N 11/08; A 61 K 37/47.**

(22) Date de dépôt..... 29 octobre 1982.
(33) (32) (31) Priorité revendiquée : *JP, 30 octobre 1981, n° 56-172908.*

(41) Date de la mise à la disposition du public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 18 du 6-5-1983.

(71) Déposant : NIPPON CHEMIPHAR CO., LTD, société de droit japonais. — JP.

(72) Invention de : Kimihiro Shimizu, Tsuguji Nakahara et Taketoshi Kinoshita.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Malémont,
42, av. du Président-Wilson, 75116 Paris.

Cette invention concerne de nouveaux dérivés activateurs de plasminogène non immunogène d'origine humaine, et plus particulièrement de tels dérivés qui comprennent au moins un polyalcoylène glycol fixé avec au moins un agent de couplage sur des chaînes latérales amino acide d'un activateur de plasminogène du type décrit ci-dessus, le polyalcoylène glycol possèdant un poids moléculaire se situant de 200 à 20000 et contenant éventuellement un ou plusieurs groupes alkyle et/ou alkanoyle comme substituants. En outre, l'invention concerne un procédé pour produire un tel nouveau dérivé et un agent thrombolytique contenant un tel nouveau dérivé.

On sait que les tissus humains contiennent une variété de substances qui activent le plasminogène en uneenzyme fibrinolytique ou plasmine. Parmi de telles substances connues, la plus représentative est un activateur de plasminogène, à savoir l'urokinase, qui est formé dans le tissu rénal et secrété dans l'urine. On peut obtenir l'urokinase par isolation et purification de l'urine humaine, culture de tissus ou technique génétique . Comme activateurs d'enzymes fibrinolytiques qui possèdent de nos jours une grande utilité commerciale, il existe des protéines issues de Streptococcus hémolytique et de l'urokinase qui est une enzyme issue de l'urine humaine. Compte tenu de son comportement en ce qui concerne le caractère immunogène, l'urokinase en provenance de cette source est favorablement utilisée dans les applications cliniques car il n'est pas immunogène à l'égard des humains. On pense que l'urokinase provenant de l'urine humaine contient à la fois de l'urokinase à haut poids moléculaire (poids moléculaire : 54000) et de l'urokinase à faible poids moléculaire (poids moléculaire : 33000). Ces dernières années, on a utilisé l'urokinase comme agent thrombolytique ou comme adjuvant pour les substances carcinostatiques et sa consommation pour des applications cliniques augmente d'année en année.

Mais, l'urokinase est instable dans certaines conditions puisque c'est une enzyme et elle perd son activité enzymatique par exemple au cours de l'extraction, de l'isolation et de la purification de la matière première contenant l'urokinase, par exemple l'urine, au cours du traitement de lyophilisation dans la préparation de formulation dosable, au cours du traitement thermique pour la désactivation des virus, ou lorsqu'elle est placée dans un état dilué dans une bouteille de goutte à goutte et maintenue pendant une longue période dans un tel état de dilution à la température ambiante pour des applications cliniques. Cette nature physiquement instable de l'urokinase a soulevé un sérieux problème dans la préparation et la formulation de l'urokinase à une échelle industrielle ou dans son utilisation réelle à des fins cliniques. On a utilisé l'albumine humaine comme additif à l'urokinase afin d'améliorer la stabilité.

Cependant, ceci ne peut en aucune manière être une solution révolutionnaire pour le problème discuté précédemment car l'albumine pure, à savoir une fraction globuline, est difficile à obtenir sans contamination immunogène ; l'albumine pure est chère ; l'albumine et l'urokinase forment un complexe de haut poids moléculaire dans des conditions de désactivation de virus qui conduisent l'urokinase à être soumise à un traitement thermique à 60° C pendant 10 heures simultanément avec l'albumine ajoutée pour stabiliser l'urokinase ; et un tel stabilisant, si on l'ajoute, peut être efficace dans une certaine mesure pour protéger l'urokinase de sa perte d'activité enzymatique lors de la lyophilisation mais ne peut pas éviter sa p erte d'activité lors de l'emploi clinique réel.

L'activité physiologique de l'urokinase lorsqu'elle est administrée par voie intraveineuse à des êtres vivants, est rapidement retardée par des inhibiteurs de protéases présents dans le sang (inhibiteurs d'α_2-macroglobuline et α_2- plasmine et les analogues) , et le taux métabolique de l'urokinase per se est très élevé, ce qui conduit à une demi-vie extrêmement raccourcie qui n'excède pas même plusieurs minutes. Rien n'a jusqu'à présent été proposé pour résoudre le problème de la brève demi-vie de l'urokinase dans le sang.

La demanderesse a effectué des recherches poussées en vue de développer de nouveaux dérivés activateurs du plasminogène non immunogène d'origine humaine qui surmontent les inconvénients des techniques de l'art antérieur mentionné ci-dessus. Comme résultat, elle a abouti à la découverte de nouveaux dérivés activateurs du plasminogène qui soient stables et difficilement retardés par les inhibiteurs présents dans le sang et donc obtenu de prolonger la demi-vie dans le sang, ce qui a conduit à la présente invention.

Un objet de la présente invention concerne un nouveau dérivé activateur du plasminogène non-immunogène d'origine humaine qui soit stable et présente une activité fibrinolytique prolongée lorsqu'il est administré à des êtres vivants.

Un autre objet de l'invention concerne la mise au point d'un procédé pour la préparation du nouveau dérivé activateur du plasminogène.

Un objet supplémentaire de l'invention est de fournir un agent thrombolytique thérapeutiquement acceptable qui comprend le nouveau dérivé activateur du plasminogène.

On a obtenu ces objets et avantages de l'invention ainsi que d'autres, p ar la réalisation d'un dérivé activateur du plasminogène non immunogène d'origine humaine, qui comprend au moins un polyalcoylène glycol fixé avec au moins un agent de couplage aux chaînes latérales amino acide de l'activateur du plasminogène, le polyalcoylène glycol possèdant un poids moléculaire se

situant dans la gamme 200-20000 et contenant éventuellement un ou plusieurs groupes alkyle et/ou alkanoyle à titre de substituants.

On aura une meilleure appréciation de la présente invention et nombre de ses avantages concomitents apparaîtront lorsqu'on aura mieux compris l'invention en référence à la description détaillée suivante soutenue par les dessins annexés.

La figure 1 représente les domaines de pH optima pour l'urokinase de poids moléculaire élevé modifiée (PEG-DCT-UK) et l'urokinase de poids moléculaire élevé non modifiée (poids moléculaire : 54000) mesurés par rapport à l'activité amidase avec un substrat synthétique (S-2444), les cercles vides correspondant à PEG-DCT-UK et les cercles pleins à l'urokinase non modifiée;

La figure 2 représente les domaines de pH optima de l'urokinase de faible poids moléculaire modifiée (PEG-DCT-L-UK) et de l'urokinase de faible poids moléculaire non modifiée (poids moléculaire : 33000) mesurés par rapport à l'activité amidase avec S-2444, les cercles vides correspondant à PEG-DCT-L-UK et les cercles pleins à l'urokinase non modifiée ;

La figure 3 représente schématiquement la stabilité de PET-DCT-UK et de l'urokinase non modifiée à température ambiante soit dans une solution saline physiologique soit dans une solution de Ringer, les lignes en traits pleins et en pointillés représentant respectivement la solution saline physiologique et la solution de Ringer, et les cercles vides correspondant à PEG-DCT-UK et les clercles pleins à l'urokinase non modifiée ;

La figure 4 représente la stabilité de PEG-DCT-L-UK et de l'urokinase non modifiée (poids moléculaire : 33000) vis-à-vis de la congélation, suivie par l'opération de dégel répétée 2, 4 et 6 fois, les cercles vides correspondant à PEG-DCT-L-UK et les cercles pleins à l'urokinase non modifiée ;

La figure 5 représente les différentes quantités, en fonction du temps, d'un inhibiteur de la plasmine dans une fraction de plasma F_1 de chacun des deux groupes de lapins en bonne santé, un groupe ayant reçu l'administration de PEG-DCT-UK et l'autre groupe d'urokinase non modifiée (poids moléculaire : 54000) les cercles vides correspondant au groupe ayant reçu l'administration de PEG-DCT-UK et les cercles pleins au groupe ayant reçu l'administration d'urokinase non modifiée ;

La figure 6 représente les différentes quantités, en fonction du temps, du plasminogène dans une fraction de plasma F_3 de chacun des deux groupes de lapins bien portant, un groupe ayant reçu l'administration de PEG-DCT-UK et l'autre groupe d'urokinase non modifiée (poids moléculaire : 54000) , les cercles vides correspondant au groupe auquel on a administré PEG-DCT-UK et les cercles

pleins au groupe auquel on administré l'urokinase non modifiée ; et

la figure 7 représente les différentes quantités, en fonction du temps, du plasminogène dans la fraction de plasma F_3 de chacun des deux groupes de lapins en bonne santé, le plasma ayant été traité avec un acide puis avec une base afin d'inactiver l'inhibiteur de la plasmine, et un groupe ayant reçu l'administration de PEG-DCT-UK et l'autre groupe d'urokinase non modifiée (poids moléculaire : 54000), avec les cercles vides qui correspondent au groupe auquel on a administré PEG-DCT-UK et les cercles pleins au groupe auquel on a administré l'urokinase non modifiée.

Par le terme "activateur du plasminogène non immunogène d'origine humaine" tel qu'il est utilisé ici, on désigne non seulement l'urokinase mais également des activateurs du plasminogène d'origine tissulaire obtenus à partir des tissus humains tels que des tissus utérins, de tumeurs et analogues. Ces activateurs du plasminogène d'origine tissulaire humaine comprennent également ceux obtenus par culture des tissus ou technique génétique. On notera qu'aucune limitation sur les poids moléculaires de ces activateurs n'est imposée dans la mesure où ils sont obtenus de la manière décrite ci-dessus . Par exemple, pour l'urokinase qui est un activateur du plasminogène issu de l'urine humaine, on peut utiliser seul ou en combinaison l'urokinase de poids moléculaire élevé (poids moléculaire : 54000) et l'urokinase de faible poids moléculaire (poids moléculaire : 33000).

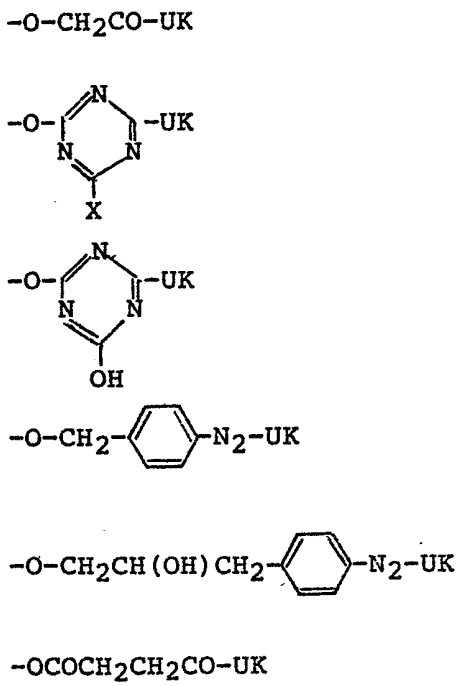
Les polyalcoylène glycols convenables que l'on peut utiliser dans l'invention sont un polyéthylène glycol et un polypropylène glycol, et dans le cas du polypropylène glycol, à la fois des p olypropylène glycols linéaires tels que ceux représentés par $HO\left[CH(CH_3)CH_2O\right]_nH$ et des polypropylène glycols ramifiés tels que ceux représentés par $CH_3CH_2C\left\{CH_2O\left[CH_2CH(CH_3)O\right]_nH\right\}_3$ ou $H\left[OCH(CH_3)CH_2\right]_nOCH\left\{CH_2\left[OCH_2CH(CH_3)\right]_nOH\right\}_2$.

Les poids moléculaires des polyalcoylène glycols peuvent se situer de 200 à 20000. Les poids moléculaires que l'on préfère plus particulièrement sont ceux qui se situent dans le domaine 500-10000.

Les polyalcoylènes glycols peuvent chacun éventuellement contenir un ou plusieurs groupes alkyle et/ou alkanoyle à titre de groupes substituants. Des exemples types de ces groupes alkyle sont le méthyle, l'éthyle, le propyle, le stéaryle et les analogues. Des exemples types de groupes alkanoyle sont les groupes acétyle, propionyle, stéaroyle et les analogues. Comme polyalcoylène glycol préféré, un polyalcoylène glycol non substitué ou substitué par un méthyle est utile.

Des agents de couplage convenables que l'on peut utiliser dans l'inven-

tion et qui sont adaptés pour fixer un polyalcoylène glycol à un activateur du plasminogène non immunogène par exemple l'urokinase, sont ceux capables de réagir avec des chaînes latérales amino-acide de la protéine à modifier et de former des liaisons chimiques entre eux, par exemple l'azothydrure d'acyle, les halogènures cyanuriques, l'éther p-diazoniumbenzylique, l'éther 3-(p-diazonium-phénoxy)-2-hydroxypropylique, l'anhydride dihalogénosuccinique et les analogues. On peut donner comme exemple de structure de couplage entre un polyalcoylène glycol et l'urokinase par l'intermédiaire de ces agents de couplage les formules partielles suivantes :



où X représente un atome d'halogène et UK une partie résiduelle de la molécule d'urokinase.

On peut préparer le nouveau dérivé d'urokinase selon l'invention en faisant réagir un produit d'enchaînement d'au moins un polyalcoylène glycol correspondant et d'au moins un agent de couplage avec l'urokinase, le polyalcoylène glycol possèdant un poids moléculaire se situant dans le domaine

200-20000 et contenant éventuellement un ou plusieurs groupes alkyle et/ou alkanoyle comme substituants.

Des exemples typiques de produits d'enchaînement polyalcoylène glycol-agent de couplage sont : le polyalcoylène glycol-4,6-dichloro-1,3,5-triazine, le polyalcoylène glycol-4,6-difluoro-1,3,5-triazine, le polyalcoylène glycol-4-chloro-6-hydroxy-1,3,5-triazine, le polyalcoylène glycol-ß-(bromocarbonyl)-monopropionate, le polyalcoylène glycol - azidocarbonyl méthylique éther, le polyalcoylène glycol-(p-diazoniumbenzyl) éther, le polyalcoylène glycol-3-(p-diazoniumphénoxy)-2- hydroxypropylique éther et les analogues.

Lorsqu'on fait réagir le produit d'enchaînement polyalcoylène glycol-agent de couplage avec l'urokinase, il est nécessaire de choisir des conditions de réaction telles que l'activité enzymatique soit maintenue pour subir un minimum de perte. Plus précisément, il est souhaitable d'effectuer la réaction à de faibles températures, par exemple à une température se situant de 0° C à la température ambiante dans une solution aqueuse telle qu'un tampon. Le temps de réaction préféré peut se situer de plusieurs minutes à cinq heures. Le pH du tampon se situe de préférence dans un domaine tel que l''activité enzymatique de l'urokinase ne soit pas abaissée, à savoir 2- 10, de préférence 5 - 9. Cependant, le domaine de pH préféré varie en fonction de la réactivité de chaque agent de couplage utilisé et/ou de la nature du résidu amino acide. On peut contrôler les degrés de modification des chaînes latérales amino-acide de l'activateur de plasminogène en changeant la concentration du polyalcoylène glycol activé avec l'agent de couplage dans le milieu de réaction. A titre d'illustration, on fait réagir l'éther monométhylique du polyéthylène glycol-4,6-dichlorol,3,5triazine d'un poids moléculaire de 5000 à pH de 7,0 avec une urokinase de poids moléculaire élevé pour obtenir de nouveaux dérivés d'urokinase en modifiant la concentration du premier réactif respectivement à 0,4, 4,0 et 6,0 mM. On détermine quantitativement les groupes ε-amino non modifiés de la lysine des dérivés d'urokinase résultants en utilisant le 2,4,6-trinitrobenzènesulfonate de sodium. On recherche leurs degrés de modifications sur la base des résultats obtenus par les analyses quantitatives. Les pourcentages de modifications des groupes ε-amino de la lysine, qui sont réactifs avec le 2,4,6-trinitrobenzènesulfonate de sodium, sont 6-7 % à 0,4 mM, environ 40 % à 4,0 mM et environ 60 % à 6,0 mM. En outre, les poids moléculaires de ces produits de réaction sont déterminés par électrophorèse sur gel de polyacryl amide SDS. Les poids moléculaires moyens des produits de réaction sont d'environ 60000 à 0,4 mM et environ 120000 à 4,0 mM. Cette découverte est

pratiquement conforme aux résultats obtenus ci-dessus par les analyses quantitatives des groupes ε-amino de la lysine. En conséquence, il est nécessaire de mener la réaction entre le polyalcoylène glycol activé avec l'agent de couplage et l'activateur du plasminogène à un niveau de pH élevé et à une concentration élevée du premier réactif, lorsqu'on désire des degrés de modifications accrus de l'activateur du plasminogène. Par ailleurs, lorsque des degrés de modifications abaissés sont préférables, la réaction doit s'effectuer à un niveau de pH relativement faible et à une faible concentration du produit d'enchaînement. Les degrés de modifications peuvent bien entendu être modifiés en contrôlant la durée de la réaction. En combinant de façon convenable ces conditions de réaction, il est possible d'obtenir les nouveaux dérivés d'activateurs du plasminogène voulus stables et avec des activités fibrinolytiques prolongées.

On peut obtenir le polyalcoylène glycol activé avec l'agent de couplage de la manière suivante. On obtient un polyalcoylène glycol substitué en position termin 4,6-dihalogèno-1,3,5-triazine en faisant réagir son polyalcoylène monosubstitué correspondant avec un halogènure cyanurique dans un solvant anhydre en présence d'une base. On forme un polyalcoylène glycol-4-halogéno-6-hydroxy-1,3,5-triazine en faisant d'abord réagir son polyalcoylène glycol correspondant avec l'halogènure cyanurique puis en traitant le produit de réaction résultant avec de l'eau. On forme un polyalcoylène glycol-acétoazothydrure en faisant réagir un anion de son polyalcoylène glycol correspondant avec le chloroacétate d'éthyle, puis ensuite en traitant le produit de réaction avec l'hydrazine et enfin en activant l'hydrazide résultant avec l'acide nitreux. On obtient un polyalcoylène-glycol- éther p-diazoniumbenzylique ou un polyalcoylène glycol-éther-3-(p-diazoniumphénoxy)-2-hydroxypropylique en faisant réagir le polyalcoylène glycol correspondant avec le chlorure de p-nitrobenzyle ou l'éther glycéryl ique de p-nitrophényle et, après réduction du groupe nitro en un groupe amino, en diazotant le produit résultant avec l'acide nitreux.

Une fois terminée la réaction du polyalcoylène glycol activé avec l'agent de couplage et de l'activateur du plasminogène, on peut effectuer l'isolation et la purification du produit de réaction d'une manière biochimique connue en elle-même dans l'art, par exemple, en utilisant seule ou en combinaison la filtration sur gel, la dialyse, la chromatographie par échange d'ion, la chromatographie d'affinité et les analogues. De préférence, on conserve le produit conjugé sous forme d'une solution contenant un tampon ou un sel physiologique, en congelant la solution au-dessous de -20° C ou en lyophilisant la solution.

Les niveaux optima de p H pour les nouveaux dérivés d'urokinase préparés ci-dessus varient en fonction des poids moléculaires et des types de polyalcoylène glycolsutilisés, des types d'agents de couplage utilisés, des degrés de modifications de l'urokinase, des conditions de la modification et des conditions de mesure telles que les substrats utilisés. Lorsqu'on effectue la mesure par rapport à l'activité d'amidase en utilisant un substrat synthétique S-2444, le niveau optimum de pH se situe d'environ 8 à 9. Dans le cas d'urokinase de haut poids moléculaire modifiée par réaction avec l'éther monométhylique du polyéthylène glycol-4,6-dichloro-1,3,5-triazine, qui possède un poids moléculaire moyen de 5000 à un pH de 7,0 à une température de 0°C pendant 3 heures, on notera que lorsqu'on utilise ce dernier réactif à une concentration de 4,0 mM (ci-après désigné en abrégé par PEG-DCT-UK), le pH optimum mesuré en fonction de l'activité amidase est de 8,2 comme indiqué dans la figure 1. Le pH optimum de l'urokinase de faible poids moléculaire modifiée dans les mêmes conditions (ci-après désigné en abrégé par PEG-DCT-L-UK) est, mesuré par rapport à l'activité amidase, de 8,2 comme indiqué dans la figure 2.

Les nouveaux dérivés d'urokinase selon l'invention possèdent une stabilité extrêmement accrue par rapport à celle de l'urokinase non modifiée. Par exemple, la figure 3 représente les résultats de l'activité de l'urokinase résiduelle obtenue en fonction du temps lorsque l'urokinase est diluée, avec une solution de Ringer ou une solution physiologique à une concentration telle qu'elle est utilisée pour l'administration au goutte à goutte dans les applications cliniques et ensuite laissée au repos à température ambiante. Comme résultat, on trouve que PEG-DCT-UK dissous à une concentration de 105,3 iu/ml dans la solution de Ringer conserve une activité de 73,4 % au début de l'expérience, même au bout de 6 heures. En plus, PEG-DCT-UK conserve une activité initiale de 79,4 % dans la solution saline physiologique. Par ailleurs, l'urokinase non modifiée dissoute à une concentration de 76,1 iu/ml dans une solution de Ringer conserve seulement 33,3 % de son activité initiale même après 2 heures. Dans une solution saline physiologique, l'activité résiduelle est aussi fabile que 26,3 %.

La figure 4 illustre les résultats obtenus en comparant la stabilité de PEG-DCT-L-UK et de l'urokinase de faible poids moléculaire non modifiée, les deux au cours d'opération de congélation suivie de dégel. Les résultats confirment que la belle stabilité de PEG-DCT-L-UK est atteinte même sous de telles conditions.

En outre, les nouveaux dérivés d'urokinase selon l'invention possèdent des activités de l'urokinase accrues dans le sang par rapport à l'urokinase

non modifiée. Par exemple, on recherche l'efficacité de l'urokinase en administrant 8000 iu/kg de chacun des PEG-DCT-UK et urokinase non modifiée à des lapins en bonne santé par injection intraveineuse, en échantillonnant le sang périodiquement avant le dosage et après un laps de temps de 4 heures et en mesurant les quantités d'inhibiteurs de plasmine et de plasminogène présents dans le plasma citraté. Les résultats sont représentés dans les figures 5, 6 et 7. Ces résultats confirment que PEG-DCT-UK modifie dans une mesure substantielle les paramètres biochimiques tels qu'inhibiteur de plasmine et plasminogène et maintient les paramètres à des valeurs abaissées pour une période de temps accrue par rapport à l'urokinase non modifiée.

En conséquence, les nouveaux dérivés d'urokinase selon l'invention sont d'excellents activateurs du plasminogène, qui, tout en maintenant le pouvoir activant de plasminogène comme le fait l'urokinase non modifiée, ont surmonté les insuffisances de l'urokinase telles que la faible stabilité et la courte demi-vie dans le sang.

Les nouveaux dérivés d'urokinase selon l'invention peuvent être utilisés comme produits pharmaceutiques pour le traitement de diverses maladies résultant de l'hypercoagulabilité du sang telles que thromboses artérielles et veineuses, obstruction de l'artère coronaire, infarctus du myocarde, infarctus intracérébral, embolie pulmonaire, néphrite et analogues. Ces dérivés d'urokinase peuvent être administrés de façon convenable par injection intraveineuse, goutte à goutte ou par voie orale. On préfère plus particulièrement l'injection intraveineuse. Comme forme dosable, celle que l'on préfère utiliser est une forme lyophilisée. Lorsqu'ils sont offerts soit sous une forme homogène, soit avec un sel physiologique tel qu'un sel d'une solution de ringer ou de chlorure de sodium, les produits lyophylisés peuvent être utilisés pour des applications cliniques par dissolution avec de l'eau distillée stérile ou dilution supplémentaire avec de l'eau distillée stérile afin d'ajuster leur pression osmotique, avant leur emploi réel. Puisque les nouveaux dérivés d'urokinase selon l'invention sont stables, ils ne nécessitent pas de stabilisants tels que l'albumine. Cependant l'addition d'un tel stabilisant ne provoque aucun problème ou inconvénient. On peut également ajouter un excipient lorsqu'on soumet les nouveaux dérivés d'urokinase à la lyophilisation.

Les nouveaux dérivés selon l'invention seront administrés à une dose fonction du poids du patient, cette dose étant généralement de 5 000 à 1 000 000 i.u/jour.

La description ci-dessus décrit de façon générale la présente invention. Une compréhension plus complète sera obtenue en référence aux exemples suivants qui sont donnés pour illustrer l'invention et non pour la limiter. La procédure de modification peut s'effectuer dans n'importe laquelle des étapes de préparation des activateurs du plasminogène.

Exemple 1

Ether monométhylique du polyéthylène glycol-4,6-dichloro-1,3,5-triazine

On dissout de l'éther monométhylique du polyéthylèneglycolquipossède un poids moléculaire moyen de 5000 (25,0 g ; 0,05 mole) par chauffage dans du benzène anhydre (200 ml). Après refroidissement de la solution résultante à température ambiante, on ajoute du carbonate de sodium anhydre (5,0 g) et du chlorure cyanurique (2,75 g ; 0,015 mole) et on agite le mélange toute la nuit à température ambiante. Une fois la réaction terminée, on filtre le mélange de réaction et on ajoute de l'éther de pétrole (600 ml) au filtrat. On recueille précipité résultant par filtration par aspiration à la pompe et on le lave avec une petite quantité d'éther de p étrole. On purifie le précipité en le faisant reprécipiter trois fois avec le benzène séché et l'éther de p étrole pour éliminer le chlorure cyanurique en excès, ce qui permet d'obtenir stoechiométriquement l'éther monométhylique du polyéthylène glycol-4,6-dichloro-1,3,5-triazine sous forme de poudre blanche. Le p roduit une fois hydrolysé présente les caractéristiques de réaction qualitatives des ions chlore ($AgNO_3$).

De façon similaire, on fait réagir chacun des éthers monométhyliques du polyéthylène glycol p ossèdant des poids moléculaires moyens de 550, 700, 2000 et 20000 respectivement, avec le chlorure cyanurique pour obtenir en quantité stoechiométrique les éthers monométhyliques des poléthylènes glycol-4,6-dichloro-1,3,5-triazines possèdant les poids moléculaires moyens correspondants.

Exemple 2

Ethers monométhyliques des polyéthylène glycol-4,6-dichloro-1,3,5-triazines (poids moléculaires moyens de leurs fragments polyéthylène glycol : 10 000 et 15 000).

On reprend l'éther monométhylique du polyéthylèneglycolpossédant un poids moléculaire moyen de 10 000 (25,0 g ; 0,025 mole) par chauffage dans du benzène à sec (200 ml). Après refroidissement de la solution résultante, on ajoute du carbonate de sodium anhydre (2,5 g) et du chlorure cyanurique (1,38 g ; 0,0075mole). On agite le mélange résultant toute la nuit à 33° C. Une fois la réaction terminée, on élimine les matières non dissoutes par filtration. On ajoute au filtrat du n-hexane (environ 600 ml) pour induire une reprécipitation. On ajoute du benzène sec (100 ml) au précipité qui est ensuite réchauffé et dissout. Ensuite, on ajoute du n-héxane (500 ml) pour induire la reprécipitation. On répète cette procédure 3 fois. Le précipité ainsi obtenu est séché toute la nuit à 50° C dans le vide, ce qui permet d'obtenir en quantité stoechiométrique l'éther monométhylique du polyéthylène glycol-4,6-dichloro-1,3,5-triazine (le poids moyen du fragment polyéthylène glycol est

de 10 000) sous forme de poudre blanche. On fait réagir de façon semblable l'éther monométhylique du polyéthylèneglycol possédant un poids moléculaire moyen de 15 000 avec le chlorure cyanurique pour obtenir en quantité stoechiométrique l'éther monométhylique polyéthylène glycol - 4,6 - dichloro - 1,3,5 - triazine (poids moléculaire moyen du fragment polyéthylène glycol : 15000).

Exemple 3

Ether monostéarylique du polyéthylène glycol -4,6-dichloro - 1,3,5,- triazine.

On dissout dans du benzène sec (200 ml) un éther monostéarylique du polyéthylène glycol possédant un poids moléculaire moyen de 3 200 (16,0 g ; 0,005 mole), et on poursuit par l'addition de carbonate de sodium anhydre (5,0 g) et de chlorure cyanurique (2,75 g ; 0,015 mole) en agitant. On agite le mélange résultant toute la nuit à température ambiante. une fois la réaction terminée, on élimine les matières non dissoutes par filtration. On ajoute au filtrat du n - hexane (environ 600 ml) pour induire la reprécipitation. On ajoute du benzène séché (100 ml) au précipité pour dissoudre ce dernier. On ajoute du n-hexane (500 ml) pour induire la reprécipitation. On répète cette procédure 3 fois pour ainsi obtenir en quantité stoechiométrique l'éther monostéarylique du polyéthylène glycol-4,6- dichloro-1,3,5- triazine (poids moléculaire moyen du fragment polyéthylène glycol : 3200) sous forme de poudre blanche.

Exemple 4

Polyéthylène glycol - 4 - chloro-6-hydroxy-1,3,5- triazine

On dissout du polyéthylène glycol possédant un poids moléculaire moyen de 6000 (33,6 g) en chauffant dans du benzène sec (150 ml). Après refroidissement de la solution résultante, on ajoute du carbonate de sodium anhydre (1,6 g) et du chlorure cyanurique (0,74 g) puis on agite le mélange résultant toute la nuit à température ambiante. Ensuite on ajoute de l'eau (1,0 ml) et on poursuit l'agitation du mélange à température ambiante pendant 6 heures puis à 40 °C pour une période équivalent à toute la nuit. On élimine les matières non dissoutes par centrifugation (2000 ppm ; 10 minutes) et on soumet la partie surnageante à une condensation sous pression réduite. On reprend le résidu en chauffant dans du benzène sec puis on évapore le solvant. On répète encore cette procédure encore 2 fois. On sèche le résidu sous pression réduite et on obtient ainsi du polyéthylène glycol -4-chloro-6-hydroxy-1,3,5-triazine (poids moléculaire moyen du fragment polythylène glycol : 6000).

On fait réagir chacun des polyéthylènes glycols possédant des poids moléculaires moyens différents de 1000 et 4000 de la même manière que ci-dessus avec du chlorure cyanurique et de l'eau ce qui conduit à la formation stoechio-

métrique de polyéthylène glycol - 4- chloro- 6-hydroxy -1,3,5 - triazines possédant les poids moléculaires moyens correspondants.

Exemple 5

Stéaroylpolyéthylène glycol -4,6-dichloro-1,3,5- triazine

On dissout dans du benzène anhydre (100 ml) du monostéarate de polyéthylène glycol possédant un poids moléculaire de 2700 (6,765 g) et on poursuit par l'addition de carbonate de sodium anhydre (2,5 g). Tout en agitant le mélange résultant, on ajoute encore du chlorure cyanurique (1,38 g). On agite le mélange résultant toute la nuit à température ambiante puis on filtre. On concentre le filtrat sous pression réduite et on sèche le résidu sous pression réduite pour obtenir ainsi en quantité stoechiométrique le stéaroylpolyéthylène glycol-4,6- dichloro-1,3,5-triazine (poids moléculaire moyen de la fraction polyéthylène glycol : 2700) sous forme d'une substance cireuse blanche.

Exemple 6

Polypropylène glycol -4-chloro-6-hydroxy-1,3,5-triazine

On reprend du polypropylène glycol possédant un poids moléculaire moyen de 1000 (4,0 g) dans du benzène anhydre (50 ml) et on poursuit par l'addition de carbonate de sodium anhydre (1,27 g). On ajoute ensuite en agitant du chlorure cyanurique (0,552 g). Après agitation du mélange résultant toute la nuit à température ambiante, on ajoute de l'eau.(1 ml). On agite le mélange à température ambiante pendant encore 6 heures. On filtre le mélange de réaction et on concentre le filtrat sous pression réduite. On ajoute au résidu du benzène anhydre et du sulfate de sodium anhydre. Ensuite, on agite le mélange à température ambiante pendant 10 minutes. Après filtration du mélange, on évapore le solvant du filtrat. On sèche le résidu sous pression réduite pour ainsi obtenir en quantité stoechiométrique de la polypropylène glycol-4- chloro-6-hydroxy-1,3,5 - triazine (poids moléculaire moyen du fragment polypropylène glycol : 1000) sous forme d'une huile visqueuse incolore.

En suivant la même procédure que celle décrite ci-dessus, on obtient une polypropylène glycol -4-chloro-6-hydroxy-1,3,5, triazine (poids moléculaire moyen du fragment polypropylène glycol : 4000) et une autre polypropylène glycol -4- chloro-6-hydroxy-1,3,5- triazine (poids moléculaire moyen du fragment polypropylène glycol : 10 000).

Les polypropylènes glycols utilisés dans les exemples ci-dessus sont d'un genre linéaire et plus précisément ceux représentés par la formule $HO\left[CH(CH_3)CH_2O\right]_nH$.

Exemple 7

Polypropylène glycol -4-chloro-6-hydroxy-1,3,5-triazine

En suivant la même procédure que dans l'exemple 1, on obtient stoechiométriquement la polypropylène glycol -4 - chloro-6- hydroxy - 1,3,5-triazine (poids moléculaire moyen du fragment polypropylène glycol : 4000) sous forme d'une substance blanche à partir de polypropylène glycol possédant un poids moléculaire moyen de 4000 (8,0 g), de benzène anhydre (80 ml) de carbonate de sodium anhydre (0,636 g) et de chlorure cyanurique (0,368 g).

Le polypropylène glycol utilisé dans cet exemple est du type ramifié et plus précisément représenté par la formule $CH_3CH_2C\{CH_2O[CH_2CH(CH_3)O]_nH\}_3$.

En outre, en utilisant le polypropylène glycol représenté par la formule

$$\begin{array}{l} CH_2O[CH_2CH(CH_3)O]_nH \\ | \\ CHO[CH_2CH(CH_3)O]_nH \\ | \\ CH_2O[CH_2CH(CH_3)O]_nH \end{array}$$

et qui possède un poids moléculaire moyen de 3000, on obtient la polypropylène glycol -4-chloro-6-hydroxy -1,3,5 - triazine (poids moléculaire moyen du fragment polypropylène glycol : 3000).

Exemple 8

Ether monométhylique du polyéthylène glycol méthoxycarbohydrazide

On reprend de l'éther monométhylique du polyéthylène glycol possédant un poids moléculaire moyen de 5000 (13,3 g ; 0,0027 mole) dans du tétrahydrofurane anhydre (400 ml) sous azote. On ajoute une petite quantité d'acide diphénylacétique comme indicateur, et on ajoute goutte à goutte du n-butyl lithium tout en refroidissant à la glace jusqu'à ce que la solution de la réaction tourne au jaune pale. Ensuite, on ajoute goutte à goutte du chloroacétate d'éthyle (5 ml ; 0,047 mole) à température ambiante, on agite toute la nuit la solution résultante puis on porte à reflux pendant 1 heure. Une fois la réaction terminée, on élimine le solvant sous pression réduite et on reprend le résidu dans de l'acétone aqueuse (200 ml). On traite la solution résultante avec du charbon. Après filtration et concentration subséquente du filtrat, on ajoute du benzène. Après élimination de l'eau par distillation azéotropique, on reprécipite le résidu à partir du benzène et du n-hexane pour obtenir une poudre jaunâtre. On dissout la poudre ainsi obtenue dans du méthanol (150 ml) puis on y ajoute de l'hydrate d'hydrazine (15 ml). On chauffe le mélange toute la nuit dans des conditions de reflux. Après avoir enlevé le solvant sous pression réduite, on ajoute de l'eau (150 ml) puis on élimine l'excès d'hydrazine par distillation azéotropique. L'eau, qui reste encore dans le résidu est éliminée de manière azéotropique en même temps que le benzène. On dissout à nouveau le résidu dans du benzène et on sèche avec du sulfate de sodium anhydre. Ensuite, on enlève le solvant et on dissout le résidu dans du benzène chaud. On traite la solution de benzène avec du charbon puis on concentre. On reprécipite le produit de la réac-

tion 2 fois avec du benzène et du n-hexane, on traite à nouveau avec du charbon et avec du gel de silice puis on reprécipite avec le benzène et le n-hexane, pour obtenir ainsi l'éther monométhylique du polyéthylène glycol méthoxycarbohydrazide sous forme de poudre blanche. De la même manière, on obtient une variété d'hydrazides en utilisant des éthers polyéthylène glycol monométhyliques possédant respectivement des poids moléculaires moyens de 550, 700, 2000, 10000, 15000 et 20000 comme produit de départ.

Exemple 9

Urokinase modifiée à l'éther monométhylique du polyéthylène glycol -4,6-dichloro-1,3,5- triazine (PEG-DCT-UK)

On ajoute tout en refroidissant à l'aide de glace un tampon phosphate 0,1 M avec un pH 7,0 (2,0 ml) à 0,61 ml d'une solution d'urokinase (poids moléculaire : 54 000 ; 66 300 iu/ml). On ajoute ensuite l'éther monométhylique du polyéthylène glycol -4,6-dichloro - 1,3,5 - triazine (poids moléculaire moyen du fragment polyéthylène glycol : 5000) dans une quantité telle qu'elle amène la concentration de la triazine à 4mM. On fait réagir le mélange en refroidissant à l'aide de glace pendant 3 heures. Une fois la réaction terminée, on transfère la solution de réaction dans un tube pour la dialyse et on élimine le dérivé triazine en excès par dialyse. On effectue la dialyse en refroidissant à l'aide de glace pendant 3 heures vis à vis d'un tampon phosphate 0,1 M (pH7,2) puis encore pendant une heure vis à vis d'une solution saline physiologique. On remplit alors le tube jusqu'à 4 ml et on stocke dans un état congelé à - 80°C. On détermine l'activité d'urokinase de l'urokinase modifiée à l'éther monométhylique du polyéthylène glycol -4,6-dichloro-1,3,5 - triazine (PEG-DCT-UK) qui est de 4550 iu/ml par la méthode de plaques de fibrine. En conséquence l'activité totale est de 18200 iu. Puisque l'activité de l'urokinase de départ est de 40443 iu, on admet une chute d'activité de 55 %. On répète la procédure ci-dessus si ce n'est qu'on remplace l'éther monométhylique du polyéthylène glycol-4,6 - dichloro -1,3,5- triazine (poids moléculaire moyen du fragment polyéthylène glycol : 5000) par les éthers monométhyliques des polyéthylènes glycols - 4,6 - dichloro-1,3,5 - triazines (poids moléculaires moyens des fragments polyéthylènes glycols : 550, 700 et 2000 respectivement) pour obtenir ainsi des urikinases modifiées possédant des activités d'urokinases de 9800, 10000 et 6500 iu/ml déterminées par la méthode de plaques de fibrine.

Exemple 10

Urokinase de faible poids moléculaire modifiée à l'éther monométhylique du polyéthylène glycol -4,6-dichloro-1,3,5 triazine (PEG-DCT-L-UK)

On ajoute tout en refroidissant avec de la glace un tampon phosphate 0,1 M avec un pH de 7,0 (4,7 ml) à 0,2 ml d'une solution d'urokinase de faible poids

moléculaire (poids moléculaire : 33000 ; 567.828 iu/ml). Ensuite, on ajoute encore de l'éther monométhylique du polyéthylène glycol-4,6- dichloro-1,3,5-triazine (poids moléculaire moyen du fragment polyéthylène glycol : 5000) dans une quantité telle qu'il amène la concentration du dérivé triazine à 4 mM. On fait réagir le mélange tout en refroidissant à l'aide de glace pendant 3 heures. Une fois la réaction terminée, on transfère la solution de réaction dans un tube de dialyse, et on élimine le dérivé triazine en excès par dialyse. On effectue la dialyse tout en refroidissant à l'aide de glace pendant 3 heures vis à vis d'un tampon phosphate 0,1 M (pH 7,2) puis encore pendant 1 heure vis à vis d'une solution saline physiologique. Après la dialyse, le contenu est complété à 8 ml et stocké dans un état congelé à - 80°C. On détermine l'activité d'urokinase de l'urokinase de faible poids moléculaire modifiée à l'éther monométhylique du polyéthylène glycol-4,6-dichloro-1,3,5 - triazine ainsi obtenue qui est de 10300 iu/ml selon la méthode de plaques de fibrine. Ainsi, l'activité totale est de 82400 iu. Puisque l'activité de l'urokinase de départ était 113 566 iu, on a une chute d'activité de 27,4 %.

Exemple 11

Urokinase modifiée à l'éther monométhylique du polyéthylène glycol -4,6-dichloro-1,3,5- triazine

En répétant la procédure de l'exemple 9 mais en modifiant à 0,4 mM la concentration de chaque éther monométhylique du polyéthylène glycol-4,6-dichloro-1,3,5- triazine, on obtient, avec des degrés de modification différents de ceux obtenus dans l'exemple 9, des urokinases modifiées à l'éther monométhylique du polyéthylène glycol -4,6-dichloro -1,3,5 -triazine (poids moléculaires moyens des fragments polyéthylènes glycols : 550, 700, 2000 et 5000 respectivement). Leurs activités d'urokinase sont 8670, 8900,6770 et 8670 iu/ml mesurées selon la méthode de plaques de fibrine.

Exemple 12

Urokinase modifiée à l'éther monométhylique du polyéthylène carbométhylazide

(1) A 200 mg d'éther monométhylique du polyéthylène glycol méthoxycarbohydrazide préparé dans l'exemple 8 (poids moléculaire moyen du fragment polyéthylène glycol : 5000) on ajoute en refroidissant avec de la glace de l'acide chlorydrique 1 N (2ml) puis une solution aqueuse de nitrite de sodium 0,008 N (1 ml). On agite le mélange résultant à température ambiante pendant 20 minutes puis on ajoute encore une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 1 N (2 ml) afin de neutraliser le mélange. On stocke à 0° C la solution résultante de l'éther monométhylique du polyéthylène glycol carboxyméthylazide

(2) On ajoute un tampon phosphate 0,1 M de pH 8,0 (3,656 ml) à 1 ml d'une solution d'urokinase (poids moléculaire : 33000, 45600 iu/ml). Ensuite, on ajoute dans des conditions d'agitation douce 0,435 ml de la solution d'éther monométhylique du polyéthylène glycol carbométhylazide préparée dans la procédure (1). On fait réagir le mélange à température ambiante pendant 2 heures. Ensuite on transfère la solution de réaction résultante dans un tube de dialyse et on la dialyse en refroidissant à la glace pendant 4 heures par rapport à un tampon phosphate 0,1 M (pH 7,2). On complète le contenu à 8 ml. On stocke la solution résultante dans un état de congélation à - 80°C. On détermine l'activité d'urokinase de l'urokinase modifiée à l'éther monométhylique du polyéthylène glycol carbométhylazide qui est de 7300 iu/ml par la méthode de plaques de fibrine. Par rapport à l'urokinase non modifiée, on constate un accroissement d'activité de 28 %.

Exemple 13

Urokinase modifiée à l'éther monométhylique du polyéthylène glycol - 4,6 - dichloro - 1,3,5 - triazine

A 0,61 ml d'une solution d'urokinase (poids moléculaire : 54000, 101167 iu/ml) on ajoute tout en refroidissant avec de la glace un tampon phosphate 0,1 M de pH 7,0 (2,0 ml) puis dans des conditions d'agitations douces l'éther monométhylique du polyéthylène glycol - 4,6 - dichloro - 1,3,5 - triazine (poids moléculaire moyen du fragment polyéthylène glycol : 10000). On ajoute le dérivé triazine dans une quantité telle qu'il amène la concentration à 0,1 mM. On fait réagir le mélange pendant 3 heures tout en refroidissant à l'aide de glace. Une fois la réaction terminée, on transfère la solution de réaction dans un tube de dialyse et on élimine le dérivé triazine en excès par dialyse. On effectue la dialyse en refroidissant à l'aide de glace pendant 3 heures par rapport à un tampon d'acide phosphorique 0,1 M additionné de 0,035 v/v % d'éthyl amine (pH 8,0) puis pendant encore 2 heures par rapport à un tampon phosphate 0,1 M (pH 7,2). On ajoute au contenu 3 p/v% d'albumine de sérum bovin (0,1 ml) puis on complète à 4,0 ml avec un tampon phosphate 0,1 M (pH 5,0). On stocke la solution résultante dans un état congelé à - 80°C. On détermine l'activité de l'urokinase modifiée à l'éther monométhylique du polyéthylène glycol -4,6 - dichloro - 1,3,5 - triazine qui est de 10 028 iu/ml selon la méthode de plaques de fibrine. Donc l'activité totale est de 40 112 iu et la chute d'activité est de 53 % .On obtient des urokinases modifiées semblables en changeant la concentration de l'éther monométhylique du polyéthylène glycol -4,6 - dichloro-1,3,5 - triazine (poids moléculaire moyen du fragment polyéthylène glycol : 10000) à 0,4 et 1,0 mM respectivement. Leurs activités d'urokinase sont 8794 et 6634 iu/ml.

De plus, on fait réagir de façon semblable l'éther monométhylique du polyéthylène glycol-4,6 - dichloro - 1,3,5- triazine (poids moléculaire moyen du fragment polyéthylène glycol : 15 000) et l'urokinase, pour obtenir ainsi l'urokinase modifiée à l'éther monométhylique du polyéthylène glycol -4,6 - dichloro -1,3,5 - triazine.(PM moyen du fragment PEG:15000).Les activités des urokinases modifiées obtenues en changeant la concentration du dérivé triazine respectivement à 0,1, 0,4 et 1,0mM sont 11388, 8580 et 7176 iu/ml.

Exemple 14

Urokinase modifiée à l'éther monostéarylique du polyéthylène glycol-4,6-dichloro -1,3,5, - triazine

A 0,2 ml d'une solution d'urokinase (poids moléculaire:54000 ; 101167 iu/ml), on ajoute tout en refroidissant à l'aide de glace un tampon phosphate 0,1 M de pH 7,0 (0,66 ml) puis l'éther monostéarylique du polyéthylène glycol -4,6-dichloro 1,3,5-triazine (poids moléculaire moyen du fragment polyéthylène glycol : 3200). On ajoute le dérivé triazine dans une quantité telle qu'elle amène la concentration à 2 mM. On fait réagir le mélange en refroidissant avec de la glace pendant 3 heures. Une fois la réaction terminée, on transfère la solution de réaction dans un tube de dialyse et on la soumet à la dialyse afin d'éliminer le dérivé triazine en excès. On effectue la dialyse en refroidissant avec de la glace pendant 4 heures, par rapport à un tampon phosphate 0,1 M de pH 7,2. On ajoute au contenu une solution aqueuse à 3,0 % d' albumine de sérum bovin (0,1 ml) puis on complète à 4,0 ml avec un tampon phosphate 0,1 M de pH 7,0. On stocke la solution résultante dans un état congelé à - 80°C. On détermine l'activité d'urokinase de l'urokinase modifiée à l'éther monostréarylique du polyéthylène glycol - 4,6 - dichloro - 1,3,5 - triazine ainsi préparée (poids moléculaire moyen du fragment polyéthylène glycol : 3200) qui est de 2826 iu/ml par la méthode de plaques de fibrine. Puisque l'activité globale est de 11 304 iu, l'activité de l'urokinase ainsi modifiée est de 55,9% de celle de l'urokinase de départ. Les activités des urokinases modifiées obtenues en changeant la concentration de l'éther monostéarylique du polyéthylène glycol - 4,6 -dichloro-1,3,5- triazine respectivement à 4,6 et 8 mM sont 2351, 1430 et 1059 iu/ml.

Exemple 15

Urokinase modifiée au polyéthylène glycol -4-chloro-6-hydroxy -1,3,5 - triazine

A 1 ml d'une solution d'urokinase (poids moléculaire :54000 ; 45600 iu/ml) on ajoute en refroidissant avec de la glace un tampon phosphate 0,05 M de pH 9,2 (4,0 ml) puis du polyéthylène glycol -4- chloro-6-hydroxy -1,3,5 - triazine (2,34 mg). Le poids moléculaire moyen du fragment polyéthylène glycol du dérivé

triazine est 6000. On fait réagir le mélange en refroidissant à la glace pendant 3 heures. Une fois la réaction terminée, on transfère la solution de réaction dans un tube de dialyse, et on élimine par dialyse le dérivé triazine en excès. On effectue la dialyse en refroidissant à la glace pendant 1 heure par rapport à un tampon phosphate 0,05 M de pH 9,2 puis encore pendant 3 heures par rapport à un tampon phosphate 0,1 M de pH 7,2. On complète le contenu à 8,0 ml avec un tampon phosphate 0,1 M de pH 7,2. On stocke la solution résultante dans un état de congélation à moins 80°C. On détermine l'activité d'urokinase de l'urokinase modifiée au polyéthylène glycol -4- chloro-6-hydroxy - 1,3,5-triazine ainsi obtenu (poids moléculaire moyen du fragment polyéthylène glycol : 6000) qui est de 460 iu/ml par la méthode de plaques de fibrine.

De même, on obtient d'autres urokinases modifiées au polyéthylène glycol -4- chloro-6-hydroxy - 1,3,5 - triazine (poids moléculaires moyens des fragments polyéthylène glycol : 4000 et 1000 respectivement).

Exemple 16

Urokinase modifiée au stéaroyl polyéthylène glycol -4,6-dichloro- 1,3,5-triazine

A 0,5 ml d'une solution d'urokinase (poids moléculaire : 54000 ;101167 iu/ml) on ajoute en refroidissant avec de la glace un tampon phosphate 0,1 M de pH 7,0 (1,5 ml) puis 0,05 ml d'une solution de dioxane de stéaroyl polyéthylène glycol -4,6- dichloro-1,3,5 - triazine (270 mg/ml) (poids moléculaire moyen du fragment polyéthylène glycol : 2700). On fait réagir le mélange en refroidissant avec de la glace pendant 3 heures. Une fois la réaction terminée, on transfère la solution de réaction dans un tube de dialyse et on la soumet à la dialyse afin d'éliminer le dérivé triazine en excès. On effectue la dialyse en refroidissant avec de la glace pendant 4 heures par rapport à un tampon phosphate 0,1 M de pH 7,2. On complète le contenu à 5 ml avec un tampon phosphate. On stocke la solution résultante dans un état de congélation à - 80°C .

On trouve que l'urokinase modifiée au stéaroyl polyéthylène glycol -4,6-dichloro-1,3,5- triazine ainsi obtenue, comme résultat de la mesure d'activité d'urokinase par la méthode de plaques de fibrine, possède une activité de 106% de celle de l'urokinase de départ.

On obtient d'autres urokinases modifiées au stéaroyl polyéthylène glycol-4 ,6 - dichloro-1,3,5- triazine possédant différents degrés de modification par réaction avec l'urokinase en utilisant une solution dans le dioxane de stéaroyl polyéthylène glycol -4,6- dichloro-1,3,5- triazine (270 mg/ml) dans des quantités respectives de 0,1 et 0,2 ml. Le poids moléculaire moyen du

fragment polyéthylène glycol du dérivé triazine est 2700. Les urokinases modifiées ainsi préparées possèdent des activités de 106 et 101 % par rapport à celles de l'urokinase de départ.

Exemple 17

Urokinase modifiée au polypropylène glycol - 4-chloro-6-hydroxy - 1,3,5 - triazine

A 0,5 ml d'une solution d'urokinase (poids moléculaire 54000 ; 101167 iu/ml) on ajoute en refroidissant avec de la glace un tampon phosphate 0,1 M de pH 7,0 (1,5 ml) puis 0,05 ml d'une solution dioxanique de polypropylène glycol -4- chloro-6-hydroxy -1,3,5- triazine (100 mg/ml) obtenue dans l'exemple 6. Le poids moléculaire moyen du fragment polypropylène glycol du dérivé triazine est 1000. On fait réagir le mélange en refroidissant avec de la glace pendant 3 heures. Une fois la réaction terminée, on transfère la solution de réaction dans un tube de dialyse et on la soumet à une dialyse afin d'éliminer le déviré triazine en excès. On effectue la dialyse en refroidissant à la glace pendant 4 heures par rapport à un tampon phosphate 0,1 M de pH 7,2. On complète le contenu à 5 ml avec un tampon phosphate puis on stocke à l'état congelé à - 80°C. On trouve que l'urokinase modifiée au polypropylène glycol -4- chloro-6-hydroxy-1,3,5- triazine ainsi obtenue conserve une activité de 96,4 % de celle de l'urokinase de départ par la méthode de plaques de fibrine. On obtient de façon semblable d'autres urokinases modifiées au polypropylène glycol -4- chloro-6-hydroxy-1,3,5 -triazine possédant différents degrés de modification en utilisant une solution dioxane de polypropylène glycol -4-chloro-6-hydroxy-1,3,5- triazine (100 mg/ml) dans des quantités respectives de 0,1 et 0,2 ml. Le poids moléculaire moyen du fragment polypropylène glycol du dérivé triazine est 1000. Les urokinases modifiées présentent des activités de 99,3 et 106,8 % par rapport à celles de l'urokinase non modifiée de départ.

Exemple 18

Urokinase modifiée au polypropylène glycol -4-chloro-6-hydroxy-1,3,5 - triazine

On obtient des urokinases modifiées au polypropylène glycol -4- chloro-6- hydroxy - 1,3,5 - triazine possédant différents degrés de modification exactement de la même manière que dans l'exemple 3 en utilisant une solution de dioxane contenant 400 mg/ml du polypropylène glycol -4- chloro-6-hydroxy - 1,3,5 - triazine obtenu dans l'exemple 7 dans des quantités respectives de 0,05 , 0,1 et 0,2 ml. Le poids moléculaire moyen du fragment polyéthylène glycol du dérivé triazine est 4000. On trouve que leurs activités urokinases sont de 89,7 , 100,0 et 98,9 % de celles de l'urokinase de départ par la méthode de plaques de fibrine.

Exemple 19

PH optimum pour l'urokinase modifiée mesuré par rapport à l'activité d'amidase.

PEG - DCT - UK obtenu dans l'exemple 9 et l'urokinase non modifiée sont chacun dilué avec une solution saline physiologique contenant 0,1 % d'albumine humaine pour donner 2 solutions de 167 iu/ml. Chacune des solutions est divisée en portions de 0,3 ml auxquelles on ajoute des tampons tris-HCl 50 mM de différents niveaux de pH (1,0 ml chaque) puis un substrat synthétique S-2444 (pyrGlu - Gly - Arg - p - nitro - anilide fabriqué par Kabi Corporation). Les mélanges résultants sont incubés à 37 °C pendant 10 minutes. On arrête alors les réactions par addition d'acide acétique à 30 %. On mesure leur absorbance à 405 nm. Comme résultat, les niveaux de pH optimum pour PEG - DCT - UK et l'urokinase non modifiée sont respectivement de 8,2 et 8,5, mesuré par rapport à l'activité d'amidase lorsqu'on utilise le substrat synthétique S - 2444. Les résultats sont indiqués dans la figure 1.

Les niveaux de pH optimum pour PEG-DCT -UK obtenus dans l'exemple 4 et l'urokinase de faible poids moléculaire non modifiée sont déterminés de façon semblable par rapport à l'activité d'amidase et on trouve qu'ils sont de 8,2 et 8,4 respectivement. Les résultats sont indiqués dans la figure 2.

Exemple 20

Stabilité de l'urokinase modifiée à température ambiante.

On dilue PEG - DCT - UK obtenu dans l'exemple 9 soit avec une solution de Ringer soit avec une solution saline physiologique pour avoir une concentration de 105,3 iu/ml. A des fins de comparaisons, on dilue également l'urokinase non modifiée soit avec une solution de Ringer, soit avec une solution saline physiologique à une concentration de 76,1 iu/ml. On laisse au repos à température ambiante (27°C) 3,5 ml de chacune de ces solutions ainsi diluées pendant 6 heures. On mesure périodiquement l'activité d'urokinase résiduelle par le méthode de plaques de fibrine jusqu'à ce qu'une période de 6 heures se soit écoulée. La valeur de la perte d'activité de l'urokinase modifiée selon l'invention est de loin plus faible que celle de l'urokinase non modifiée. Les résultats sont indiqués dans la figure 3;

Exemple 21

Stabilité de l'urokinase modifiée vis à vis du traitement de congélation et de dégel

On dilue PEG-DCT-L-UK obtenu dans l'exemple 10 avec une solution saline physiologique à une concentration de 200 iu/ml. A des fins de comparaisons, on dilue l'urokinase de faible poids moléculaire non modifiée avec une solution

saline physiologique à une concentration de 200 iu/ml. On congèle à -80°C chacune de ces solutions ainsi diluée et ensuite on les dégèle à température ambiante. Les opérations de congélation et de dégel sont répétées 0, 2, 4 et 6 fois. On mesure l'activité d'urokinase résiduelle en utilisant un substrat synthétique S-2444 (fabriqué par Kabi Corporation). La valeur de perte d'activité de l'urokinase modifiée selon l'invention est extrêmement plus faible par rapport à celle de l'urokinase de faible poids moléculaire non modifiée. Les résultats sont indiqués dans la figure 4.

Exemple 22

Huit lapins mâles en bonne santé (japonais blanc) pesant chacun 2,6 à 3,1 kg sont partagés en deux groupes. A l'un des groupes on administre 8000 iu/kg PEG-DCT-UK et à l'autre 8000 iu/kg d'urokinase non modifiée, dans les deux cas par veines de l'oreille. On recueille le sang des veines de l'oreille avant l'administration et à des périodes de 1, 2 et 4 heures après l'administration. On ajoute aux échantillons de sang une solution de citrate de sodium pour séparer le plasma. Après épuisement par lavages des urokinases modifiées et non modifiées pendant 18 jours, on croise les deux groupes l'un avec l'autre et on effectue des expériences semblables pour produire des échantillons de plasma. Une partie de chacun des échantillons de plasma ainsi obtenus est séparée et soumise à une chromatographie sur colonne d'affinité en utilisant la Lysine Sépharose 4B, pour obtenir ainsi une fraction d'inhibiteur de plasmine (fraction F1) et une fraction de plasmine et de plasminogène (fraction F3). On détermine les modifications dans la quantité de l'inhibiteur de plasmine dans la fraction F_1 au cours de l'écoulement de temps en ajoutant de la plasmine à la fraction F_1 et en mesurant la quantité de plasmine résiduelle qui n'est pas affectée défavorablement par l'inhibiteur, à l'aide d'un substrat synthétique S -2251 (fabriqué par Kabi Corporation). L'inhibiteur de plasmine du groupe auquel on a administré PEG-DCT-UK présente sa diminution apparente et sa récupération plus lente. Dans le groupe auquel on a administré l'urokinase non modifiée, la diminution dans l'inhibiteur de plasmine est plutôt moindre et ses modifications au cours du temps ne sont pas nettes. Les résultats sont indiqués dans le figure 5.

Par ailleurs, la quantité de plasminogène dans la fraction F_3 est déterminée en ajoutant l'urokinase à la fraction F_3 pour produire la plasmine et en mesurant la quantité de la plasmine ainsi produite à l'aide d'un substrat synthétique S-2251. Dans le groupe auquel on a administré PEG-PCT-UK, le plasminogène diminue d'environ 50 % après 2 heures, et ensuite retrouve graduellement teneur initiale. Cependant, dans le groupe auquel on a administré l'urokinase non modifiée, le plasminogène diminue jusqu'à environ 65 % après 1 Heure mais ne

continue pas à diminuer plus. On observe une tendance du plasminogène à retrouver sa teneur initiale même 2 heures après l'administration. Les résultats sont illustrés dans la figure 6.

En outre, une partie de chaque plasma est échantillonnée et traitée avec un acide à pH 5,2 afin d'y désactiver l'inhibiteur. Ensuite, on neutralise et on mesure la quantité de plasminogène présent dans le plasma traité à l'acide en ajoutant l'urokinase au plasma traité à l'acide pour produire de la plasmine et en mesurant la quantité de plasmine ainsi produite en utilisant un substrat synthétique S-2251. Dans le groupe auquel on a administré PEG-DCT-UK, le plasminogène diminue jusqu'à environ 70 % après 2 heures mais retrouve ensuite graduellement sa teneur initiale. Cependant, dans le groupe auquel on a administré l'urokinase non modifiée, la quantité de plasminogène diminue jusqu'à environ 84 % après 1 heure mais ne continue pas à diminuer. Ensuite, la quantité de plasminogène augmente graduellement. Les résultats sont également indiqués dans la figure 6. Incidemment, on ne détecte pas d'activité de plasmine dans la fraction F_3.

Exemple 23

Produit lyophilisé qui convient pour la préparation de formulations injectables.

On concentre la solution de PEG-DCT-UK obtenue dans l'exemple 9 à l'aide d'un filtre à membrane (marque : Amicon Gel) puis on lui ajoute une solution saline physiologique et un tampon phosphate 0,05 M. On filtre de façon aseptique le mélange résultant en utilisant un filtre à membrane. On verse le filtrat en portions dans des ampoules stérilisées puis on le lyophilise. On trouve que l'activité fibrinolytique du produit lyophilisé de PEG -DCT-UK qui convient pour la préparation des formulations injectables est de 57000 iu/ampoule par la méthode de plaques de fibrine.

Exemple 24

Produit lyophilisé qui convient pour la préparation de formulations injectables.

On concentre la solution de PEG-DCT-UK obtenue dans l'exemple 9 à l'aide d'un filtre à membrane (marque : Amicon-Gel) puis on y ajoute une solution saline physiologique. On filtre de façon aseptique le mélange résultant en utilisant un filtre à membrane. On verse le filtrat en portions dans des ampoules stérilisées puis on le lyophilise. On trouve que l'activité fibrinolytique du produit lyophilisé de PEG-DCT-UK ainsi obtenue qui convient pour la préparation de formulations injectables est de 67000iu/ampoule par la méthode de plaques de fibrine. Maintenant l'invention a été totalement décrite et il est clair pour l'homme de l'art qu'il est possible d'y apporter de nombreuses modifications et de nombreux changements sans pour autant sortir

de la portée ou de l'esprit de cette invention.

REVENDICATIONS

1. Dérivé d'un activateur de plasminogène non-immunogène d'origine humaine, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un polyalcoylène glycol fixé avec au moins un agent de couplage aux chaines latérales amino-acide de cet activateur de plasminogène, le polyalcoylène glycol possédant un poids moléculaire se situant dans le domaine de 200 - 20000 et contenant éventuellement un ou plusieurs groupes alkyle et/ou alkanoyle comme groupes substituants.

2. Dérivé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'activateur de plasminogène est l'urokinase.

3. Dérivé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le polyalcoylène glycol est choisi dans le groupe comprenant un polyéthylène et un polypropylène glycol qui peut éventuellement contenir un ou plusieurs groupes alkyle et/ou alkanoyle comme groupes substituants.

4. Dérivé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 3, caractérisé en ce que le polyalcoylène glycol est un éther monoalkylique du polyéthylène glycol.

5. Dérivé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 3, caractérisé en ce que le polyalcoylène glycol est un polypropylène glycol.

6. Dérivé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le polyalcoylène glycol possède un poids moléculaire qui se situe dans le domaine de 500 - 10000.

7. Dérivé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'agent de couplage est un halogénure cyanurique.

8. Urokinase modifiée à l'éther monométhylique de polyéthylène glycol-4,6-dichloro-1,3,5- triazine, dont le fragment polyéthylène glycol possède un poids moléculaire moyen de 5000.

9. Urokinase modifiée au polypropylène glycol-4-chloro-6-hydroxy-1,3,5-triazine, dont le fragment polypropylène glycol possède un poids moléculaire moyen de 4000.

10. Procédé de préparation d'un dérivé d'un activateur de plasminogène non-immunogène d'origine humaine, caractérisé en ce qu'il consiste à faire réagir un produit d'enchaînement d'au moins un polyalcoylène glycol et d'au moins un agent de couplage avec un activateur de plasminogène, le polyalcoylène glycol possédant un poids moléculaire dans le domaine de 200 - 20000 et contenant éventuellement un ou plusieurs groupes alkyle et/ou alkanoyle comme groupes substituants.

11. Procédé selon la revendication 10 caractérisé en ce que l'activateur de plasminogène est l'urokinase.

12. Procédé selon la revendication 10 ou 11, caractérisé en ce que le produit d'enchaînement et l'activateur de plasminogène réagissent dans des conditions telles que ledit activateur ne perde pas son activité physiologique.

13. Agent thrombolytique caractérisé en ce qu'il comprend un dérivé d'un activateur de plasminogène non-immunogène d'origine humaine selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.

FIG. 1

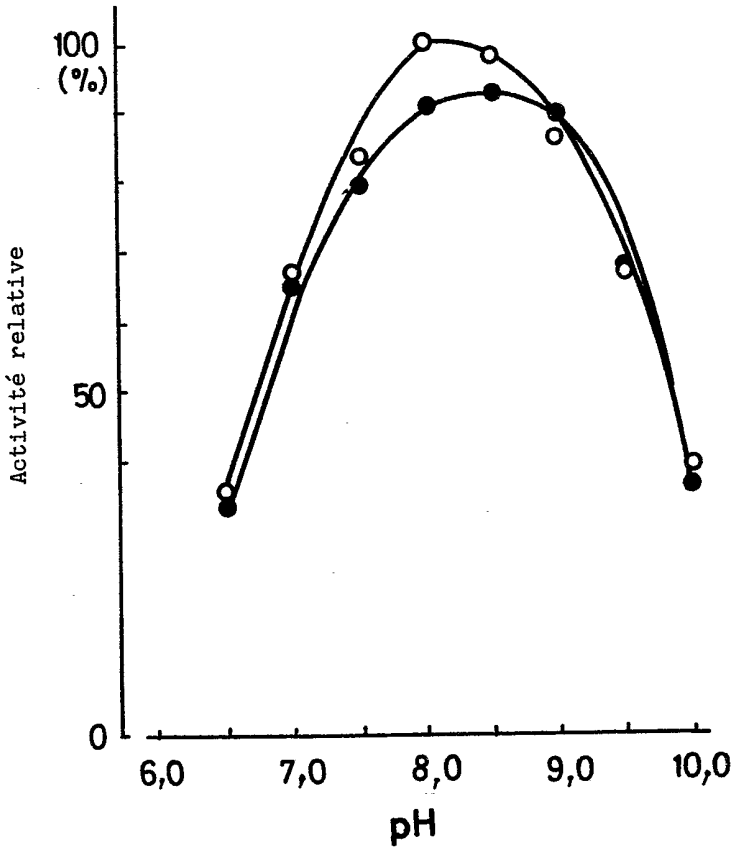


FIG. 2

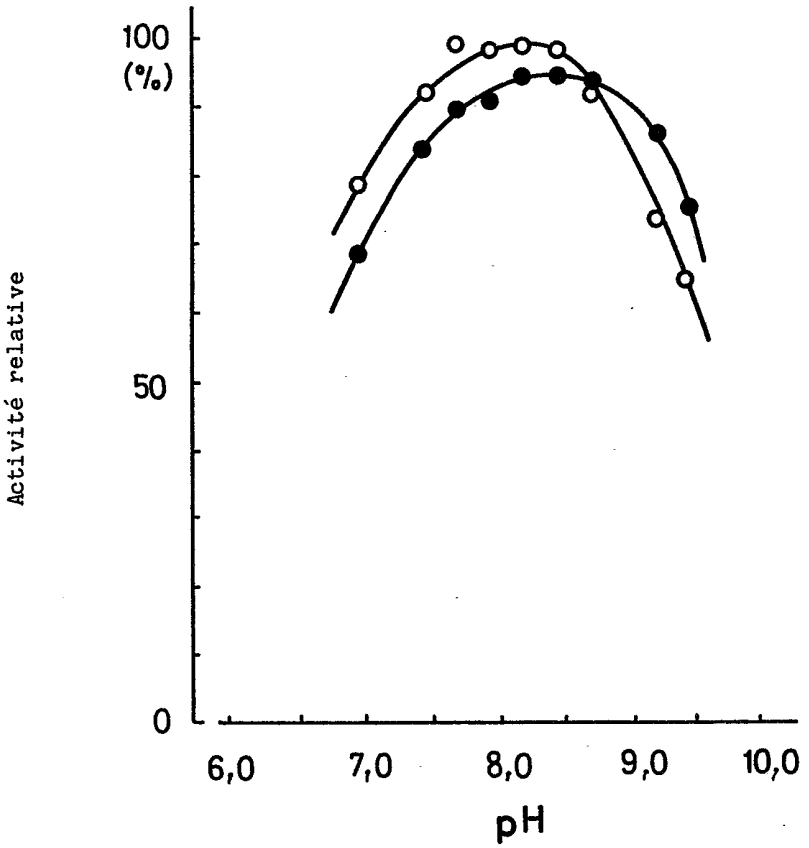


FIG. 3

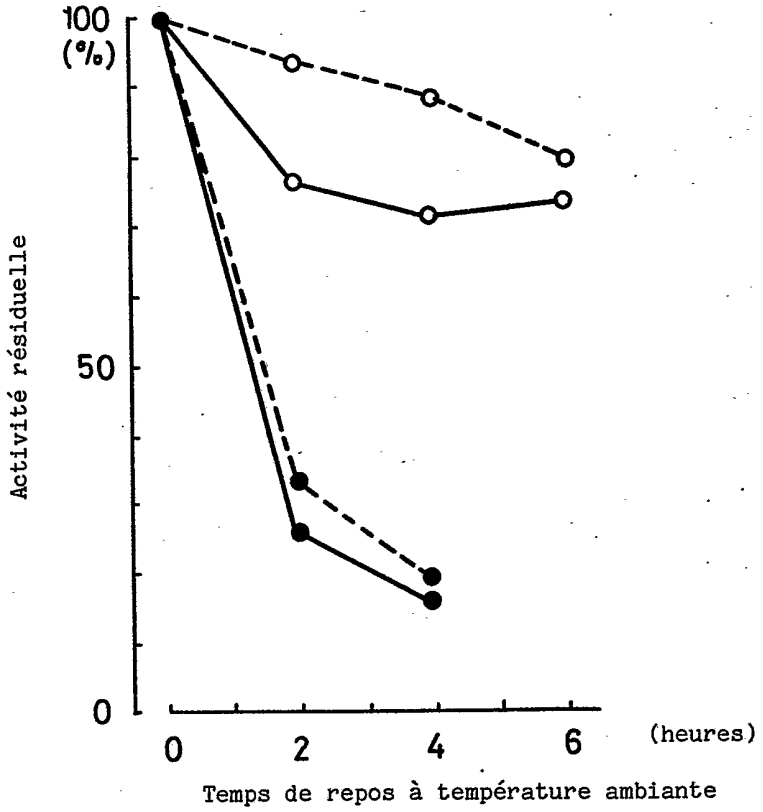

100
(%)
50
0
Activité résiduelle
0
2
4
6
(heures)
Temps de repos à température ambiante

FIG. 4

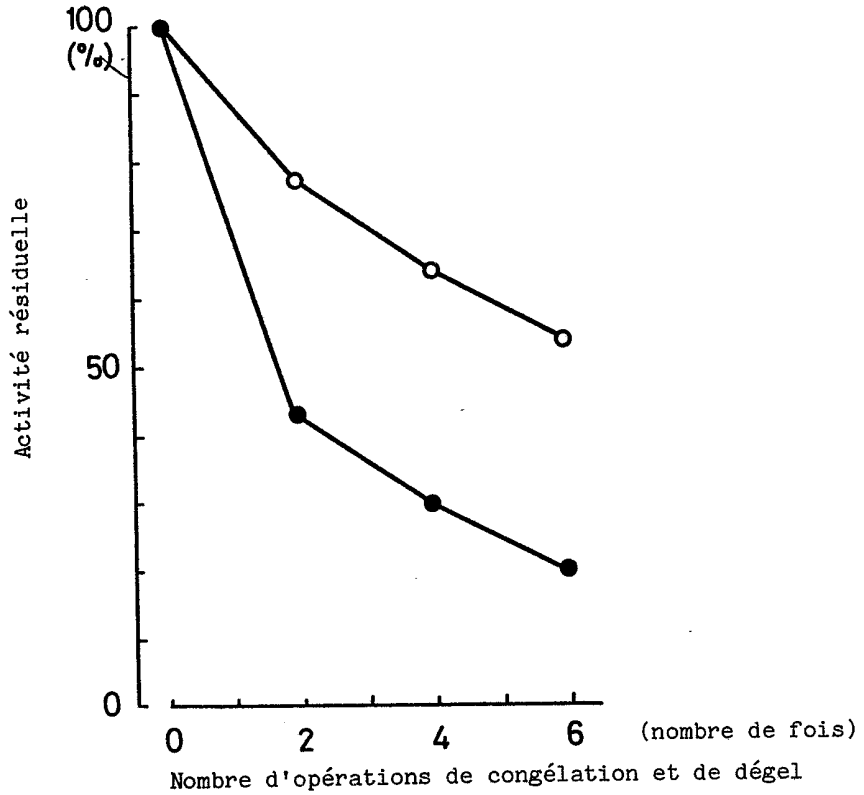

100
(%)
50
0
Activité résiduelle
0
2
4
6
(nombre de fois)
Nombre d'opérations de congélation et de dégel

FIG. 5

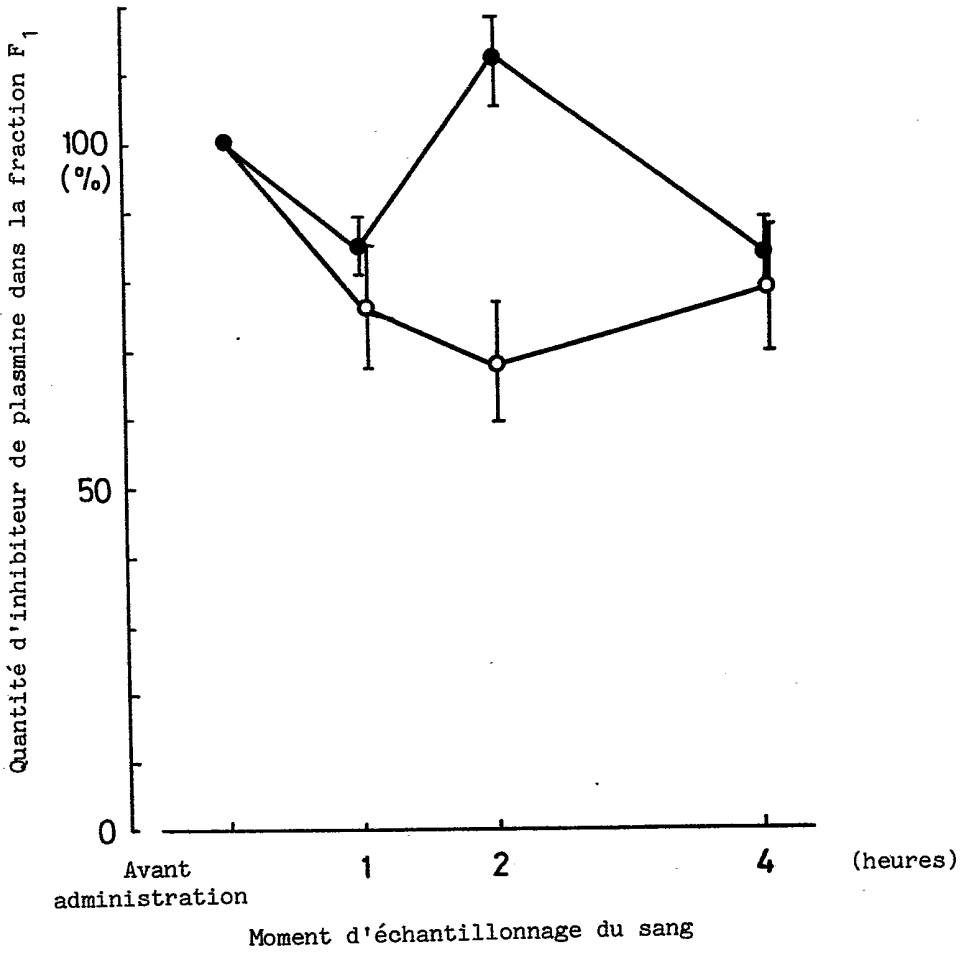

Quantité d'inhibiteur de plasmine dans la fraction F_1
100
(%)
50
0
Avant
administration
1
2
4
(heures)
Moment d'échantillonnage du sang

FIG. 6

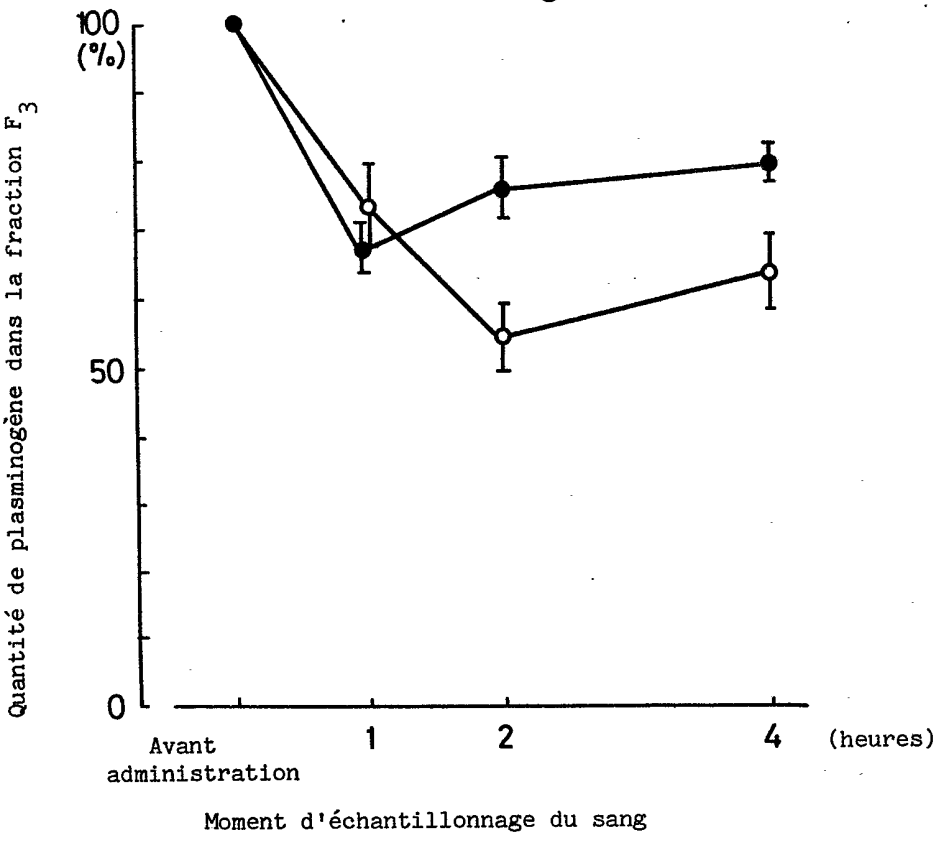
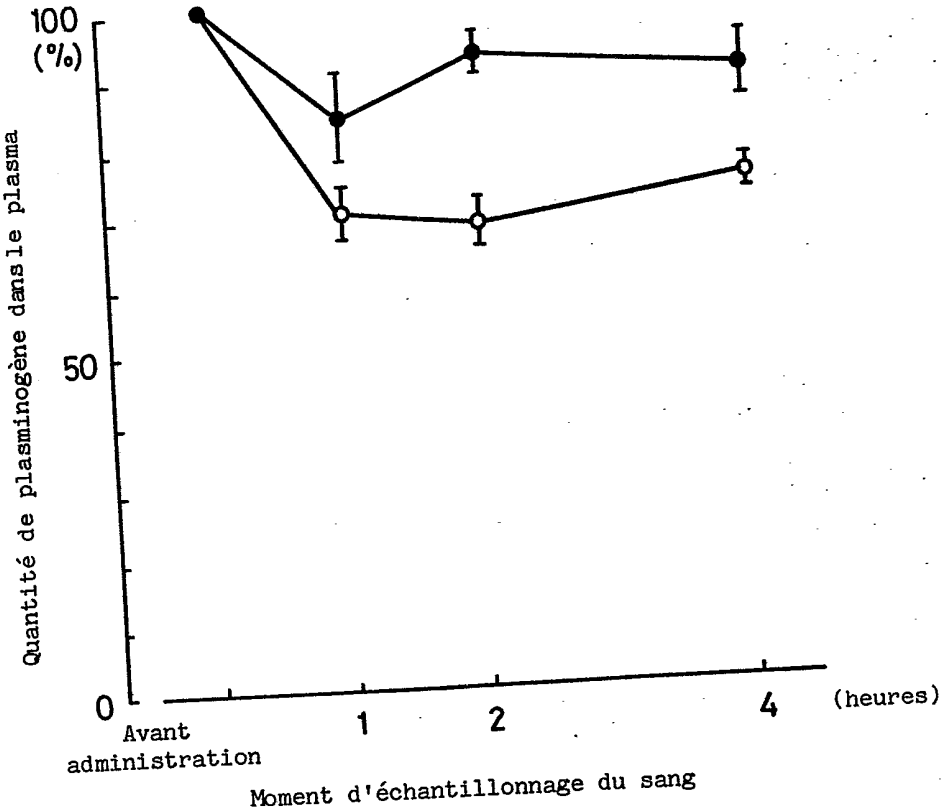

100
(%)
50
0
Quantité de plasminogène dans la fraction F_3
Avant
administration
1
2
4
(heures)
Moment d'échantillonnage du sang

FIG.7


100
(%)
50
0
Quantité de plasminogène dans le plasma
Avant
administration
1
2
4
(heures)
Moment d'échantillonnage du sang