(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication : **2 661 920**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **90 05808**

(51) Int Cl^5 : C 12 Q 1/37

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt** : 10.05.90.

(30) **Priorité** :

(43) **Date de la mise à disposition du public de la demande :** 15.11.91 Bulletin 91/46.

(56) **Liste des documents cités dans le rapport de recherche :** *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

(71) **Demandeur(s) :** *Société à responsabilité limitée dite : SERBIO* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** Contant Geneviève épouse Pussard, Martinoli Jean-Luc et Quentin Gérard.

(73) **Titulaire(s) :**

(74) **Mandataire :** S.A. Fedit-Loriot & Autres Conseils en Propriété Industrielle.

(54) Procédé de détermination d'un activateur du plasminogène et de son inhibiteur.

(57) La présente invention concerne l'utilisation d'une substance inhibant les protéines plasmatiques α_2-AP et/ou α_2-M dans le domaine de la détermination et du dosage des activateurs du plasminogène et des inhibiteurs desdits activateurs du plasminogène.

Elle concerne en particulier un procédé pour la détermination (i) d'un activateur du plasminogène choisi parmi l'ensemble constitué par les activateurs du plasminogène de type tissulaire (tPA) et les activateurs du plasminogène de type urokinase (uPA), et (ii) d'un inhibiteur (PAI) dudit activateur du plasminogène, ledit procédé, qui comporte la transformation du plasminogène en plasmine puis le dosage de la plasmine résultante de ladite transformation, étant caractérisé en ce qu'il comprend l'inhibition des protéines plasmatiques α_2-antiplasmine et/ou α_2-macroglobuline au moyen d'une substance choisie parmi l'ensemble constitué par les matériaux métalloprotéinasiques.

FR 2 661 920 - A1

2661920

PROCEDE DE DETERMINATION D'UN ACTIVATEUR DU PLASMINOGENE ET DE SON INHIBITEUR

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention concerne une nouvelle solution technique pour la détermination ou le dosage d'un activateur du plasminogène choisi parmi l'ensemble constitué par les activateurs du plasminogène de type tissulaire et de type urokinase, d'une part, et d'un inhibiteur dudit activateur du plasminogène, d'autre part.

Elle vise le procédé pour la détermination d'un activateur du plasminogène et de son inhibiteur, qui comprend selon ladite nouvelle solution l'inhibition de deux protéines plasmatiques : les α_2-antiplasmine (α_2-AP) et α_2-macroglobuline (α_2-M).

ART ANTERIEUR

Les activités des activateurs du plasminogène de type tissulaire (tPA) et de type urokinase (uPA) sont régulées par une substance inhibitrice dénommée inhibiteur d'activateur du plasminogène (PAI). On sait en particulier que les tPA et PAI jouent un rôle très important dans la régulation de la fibrinolyse et que les méthodes antérieurement connues pour leur dosage reposent sur le principe de la mesure de la plasmine, qui a été générée dans le système à partir du plasminogène, au moyen d'un substrat peptidique (fluorogène ou mieux chromogène) spécifique de la plasmine.

La fibrinolyse a pour but de restaurer la perméabilité vasculaire en dégradant les dépôts de fibrine susceptibles de se former sur les parois vasculaires. La

fibrinolyse est assurée par la plasmine qui est un enzyme très puissant circulant dans le plasma sous sa forme inactive : le plasminogène.

L'activation du plasminogène en plasmine peut se dérouler selon deux voies : une voie dite intrinsèque (ou endogène) et une voie dite extrinsèque (ou exogène). In vivo la fibrinolyse est perpétuellement régulée par un système d'inhibiteurs de telle façon que la fluidité sanguine soit toujours maintenue. Pour information, les mécanismes de la fibrinolyse ont été schématisés dans la figure 1 ci-après avec les interventions des activateurs et des inhibiteurs. Dans la figure 1, chaque flèche en trait épais continu désigne une activation, et chaque flèche en trait épais discontinu désigne une inhibition.

L'urokinase [également dénommée activateur du plasminogène de type urokinase (en abrégé : uPA)] intervient dans les mécanismes (voie intrinsèque) de la fibrinolyse d'abord sous la forme prourokinase [dénommée activateur du plasminogène de type urokinase de structure monocaténaire (en abrégé : scuPA)] puis sous la forme d'urokinase dite de haut poids moléculaire [également dénommée activateur du plasminogène de type urokinase de structure bicaténaire (en abrégé : tcuPA ou HMW-UK)]. Le tPA intervient dans les mécanismes (voie extrinsèque) de la fibrinolyse sous la forme dite sctPA [dénommée activateur du plasminogène de type tissulaire de structure monocaténaire (autre abréviation donnée dans la littérature : tPA-I)] et sous la forme dite tctPA [dénommée activateur du plasminogène de type tissulaire de structure bicaténaire (autre abréviation donnée dans la littérature : tPA-II)].

Il convient cependant de remarquer que, à l'état physiologique, le scuPA (voie intrinsèque) semble responsable, en grande partie, de l'activité fibrinolytique, et le tPA (voie extrinsèque) n'intervient que faiblement

[95 % environ du tPA sont rapidement complexés par le PAI-1 dès sa libération; seuls restent 5 % environ du tPA sous forme libre et donc active dans le plasma]. En revanche, dès que l'organisme subit une agression quelconque, la voie extrinsèque joue alors un rôle prépondérant et essentiel pour pallier la formation excessive de plasmine.

Le tPA est principalement libéré des cellules endothéliales. Il peut être extrait de différents tissus d'origine animale (ovaire et coeur de porc) ou humaine (utérus). Toutefois, comme la quantité de tPA purifié extraite de ces tissus est infime, la source principale de tPA purifié que l'on préfère provient de la culture cellulaire de mélanomes humains (BOWES). Grâce à cette culture cellulaire qui sécrète beaucoup de tPA, on a pu obtenir le tPA purifié, estimer son poids moléculaire, déterminer sa structure biochimique et caractériser ses activités physiologiques. Le tPA est une sérine protéase ayant un poids moléculaire moyen d'environ 70 000 daltons, capable de transformer le plasminogène en plasmine. La présence de fibrine permet une activation optimale du plasminogène par le tPA.

L'inhibiteur d'activateur du plasminogène [en abrégé :PAI] intervient dans la régulation des activateurs du plasminogène. On connaît essentiellement quatre formes de PAI, à savoir le PAI-1 (inhibiteur 1 des activateurs du plasminogène), le PAI-2 (inhibiteur 2 des activateurs du plasminogène), le PAI-3 (inhibiteur 3 des activateurs du plasminogène) et la protéase nexine [voir Thrombosis and Haemostasis 56 (No 3), pages 415-416, (1986)].

Les inhibiteurs du tPA, qui sont également désignés sous le nom d'anti-activateurs, sont principalement de deux types :

le PAI-1 qui est présent dans le plasma et les granules alpha des plaquettes, et qui réagit aussi bien avec le tPA que l'urokinase pour donner des complexes inactifs : (tPA-PAI-1) et (uPA-PAI-1); comme la vitesse de complexation est très élevée, le fait qu'il existe du PAI-1 libre dans un plasma, implique qu'il ne peut pas il y avoir dans ce plasma de tPA libre actif; et

le PAI-2 qui est d'origine probablement ma-crophagique, qui est à sa concentration maximale chez la femme enceinte au 3è trimestre de la grossesse, et qui, s'il forme des complexes inactifs avec le tPA, possède une affinité plus grande vis-à-vis de l'uPA; [voir E.D. SPRENGERS et al., Blood 69, (No 2), pages 381-387 (1987)].

En d'autres termes, on sait que les activités des activateurs du plasminogène de type tissulaire et urokinase sont régulées par au moins deux inhibiteurs spécifiques de type endothélial (PAI-1) et placentaire (PAI-2) et que les couples tPA/PAI et uPA/PAI ont un rôle essentiel dans la régulation de la fibrinolyse.

On sait par ailleurs que l'activité antiplasminique du plasma, qui est très importante, est principalement localisée au niveau des α_1-globulines et α_2-globulines. On connaît six protéines plasmatiques capables d'inhiber la plasmine en système purifié; ce sont :

- l'α_1-antitrypsine,
- l'inter-α-antitrypsine,
- l'inhibiteur de la C1 estérase (en abrégé C1-Inh),
- l'antithrombine III (en abrégé AT III),

- l'α_2-macroglobuline (en abrégé α_2-M), et
- l'α_2-antiplasmine (en abrégé α_2-AP).

En présence de concentrations plasmatiques normales en α_2-AP et α_2-M, les autres inhibiteurs de la plasmine interviennent peu dans l'inactivation de la plasmine. Le rôle de l'α_2-M est d'inhiber la plasmine en excès quand il n'y a plus d'α_2-AP libre. Ces inhibiteurs, principalement α_2-AP et α_2-M interfèrent de façon significative dans les dosages de PAI [voir l'article de G. CONTANT et al. Thrombosis Research 56, pages 377-386, (1989) et l'exposé de W. KAUSEL et al. présenté lors du Congrès de la Ligue Méditerranéenne de Lutte contre la Thrombose de 1988 à Athènes et intitulé : "Relative Contribution of Known Plasminogen Activator Inhibitors (PAIs) to the tPA and uPA Inhibitory Capacity of Plasma"].

Les méthodes qui ont déjà été préconisées, pour le dosage de tPA et PAI sont schématisées par les diagrammes A et B qui suivent. Elle reposent sur la mesure de la plasmine générée dans le système au moyen d'un substrat spécifique de la plasmine.

Diagramme A - dosage du tPA -

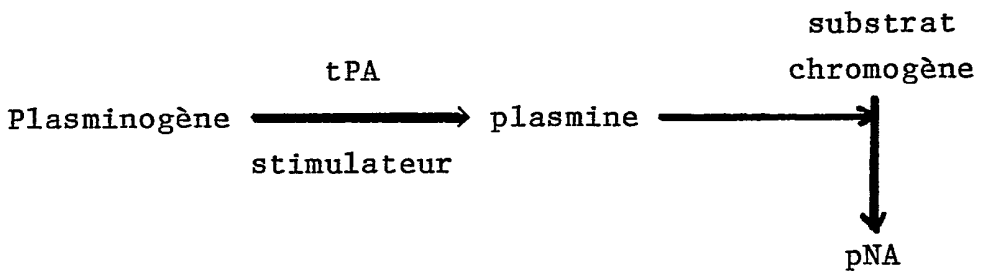
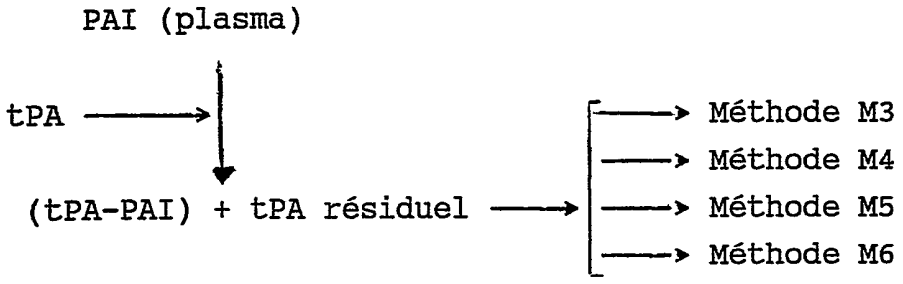


Diagramme B - dosage du PAI (PAI-1)



On sait en particulier que les méthodes de dosage de l'activité biologique du tPA ont été préconisées dans le passé en phase solide et en phase liquide.

En phase solide (méthode M1), on connaît une technique fondée sur la fixation d'un réseau de fibrine à la surface de cupules d'une microplaque; après fixation de la source de tPA, des lavages sont effectuées afin d'éliminer la plupart des facteurs gênant la génération de plasmine. Cette technique présente des avantages :

- utilisation de toute source de tPA, comme le plasma,
- l'activité mesurée est spécifique du tPA et indépendante de la prourokinase [en abrégé : scuPA] et de l'urokinase [en abrégé : tcuPA].

Voir à cet effet les modalités de la méthode M1 décrite par E. ANGLES-CANO et al., "A Spectrophotometric Solid-Phase Fibrin-Tissue Plasminogen Activator Activity Assay (SOFIA-tPA) for High Fibrin Affinity Tissue Plasminogen Activators" Anal. Biochem., 153, pages 201-210, (1986).

En phase liquide (méthode M2), on connaît une technique selon laquelle, à la source de tPA à doser, on ajoute du plasminogène en excès et des fragments de fibrinogène solubles comme stimulateur. La plasmine en excès générée coupe le substrat spécifique de la plasmine [par exemple l'un des substrats CBS 30.41 (H-D-Abu-L-CHA-L-Lys-pNA) ou CBS 33.08 (H-D-Nle-L-CHA-L-Arg-pNA) commercialisés par la

société DIAGNOSTICA STAGO] et libère pNA détectable (notamment à 405 nm). La source de tPA peut être soit du tPA purifié (extrait de mélanome comme indiqué ci-dessus) que l'on utilise pour l'étalonnage, soit des euglobulines plasmatiques (dilution 1/10 et à pH 5,9), c'est-à-dire une source de tPA dépourvue d'inhibiteurs de la plasmine (surtout l'α_2-AP) qui gêneraient la deuxième étape de la réaction.

La méthode M2 est illustrée par la notice du test de dosage "STACHROM PA" de la société DIAGNOSTICA STAGO (référence No 0822 du catalogue de cette société).

L'activité mesurée est particulièrement liée au tPA grâce aux fragments de fibrinogène, mais elle est amplifiée par les autres voies d'activation (Facteur XII, prourokinase, urokinase). Pour que la mesure de l'activité soit spécifique du tPA, il est nécessaire d'ajouter des anticorps anti-tPA.

On connaît également une autre méthode (méthode M7) qui consiste à séparer le tPA libre par adsorption sur colonne de lysine-sépharose et qui a été décrite par E.GYZANDER et al., Thromb. Res., 35, pages 547-548, (1984).

Les méthodes applicables au dosage du PAI sont également applicables au dosage du tPA, dès lors qu'elles reposent sur la détermination du tPA résiduel après complexation du PAI contenu dans le plasma à tester. Elles comprennent notamment la méthode M3 décrite par C.KORNINGER et al., Thromb. Haem., 46, pages 622-665, (1981) et 52, pages 127-130, (1984) qui met en oeuvre des euglobulines; la méthode M4 décrite par J.CHMIELEWSKA et al., Thromb. Res., 31, pages 427-436, (1983) qui fait appel à du plasma acidifié; la méthode M5 décrite par J.H. VERHEIJEN et al., Thromb. Haem., 48, pages 266-269, (1982) qui fait appel à la précipitation des euglobulines sur plasma pur ou dilué; et la méthode M6 décrite dans

l'article de G. CONTANT et al. précité et utilisée dans la trousse de dosage commercialisée sous la nomenclature "STACHROM PAI" (référence No 0824) par la société DIAGNOSTICA STAGO. Pour que la technique de G. CONTANT et al., précitée soit spécifique, il est important de diluer l'échantillon à tester dans du plasma déplété (i.e. appauvri ou épuisé) en PAI, l'interférence des inhibiteurs de la plasmine (autres que α_2-AP et α_2-M), apportés par le plasma devient alors négligeable.

Le principal inconvénient des méthodes précitées pour doser le tPA et/ou le PAI réside dans la nécessité de séparer le tPA libre des complexes tPA-PAI et uPA-PAI et d'empêcher l'action des inhibiteurs de la plasmine (plus particulièrement α_2-AP et α_2-M) par

-acidification du plasma (voir méthode M4),

-précipitation des euglobulines (voir méthode M5),

ou

-adsorption sur colonne (voir méthode M7).

En bref, les méthodes antérieurement connues M1-M7 sont longues et délicates à mettre en oeuvre et sont susceptibles d'être déficientes en ce qui concerne la reproductibilité et/ou la sensibilité des dosages.

Par ailleurs, comme on connaît l'inactivation des α-antiplasmines par oxydation notamment de l'article de D.JOHNSON et al., J.Biol.Chem., 254, pages 4022-4026, (1979), du résumé No 01358 de la communication de D. LAWRENCE et al.,(congrès "Thrombosis and Haemostasis" de 1985 à San Diego) et de l'article de D. LAWRENCE et al., Biochem., 25, pages 6351-6355, (1986) au moyen de chloramine T, on sait que l'on a proposé une nouvelle méthode (méthode M8) qui consiste à ajouter un oxydant spécifique des groupements méthionine, tel que la chloramine T, pour inhiber l'action de l'α_2-AP. [Voir à cet effet les articles de T.W.STIEF et al., Thromb. Res., 49, pages

581-589, (1988), 50, pages 559-573 (1988), 56, pages 213-220, (1989), la demande de brevet européen publiée EP-A-0 297 597, et la notice de la trousse de dosage commercialisée par la société BEHRING DIAGNOSTIKA sous la nomenclature "PAI-TEST" intitulée "FUNKTIONELLE BESTIMMUNG DES PLASMINOGEN-AKTIVATOR-INHIBITORS" (novembre 1988)]. Comme la chloramine T et les autres moyens oxydants sont des produits de manipulation délicate, il est apparu un besoin d'une nouvelle solution technique pour la détermination des activateurs du plasminogène de type tissulaire et de type urokinase, d'une part, et de leurs inhibiteurs, d'autre part, faisant appel à des moyens différents de ceux préconisés auparavant.

BUT DE L'INVENTION

La nouvelle solution technique que l'on préconise selon l'invention pour la détermination d'un activateur du plasminogène choisi parmi l'ensemble constitué par les activateurs du plasminogène de type tissulaire et de type urokinase, d'une part, et d'un inhibiteur dudit activateur du plasminogène, d'autre part, repose sur l'utilisation d'un nouveau moyen inhibant ou annihilant les inhibiteurs de la plasmine, α_2-AP et/ou α_2-M.

Plus précisément, la présente invention repose sur la découverte surprenante que des venins de serpent contenant un matériau métalloprotéinasique inhibant les α_2-AP et/ou α_2-M et décrits dans l'article de L.F.KRESS intitulé "The Action of Snake Venom Metalloproteinases on Plasma Proteinase Inhibitors" et publié dans l'ouvrage "HEMOSTASIS AND ANIMAL VENOMS" de Hubert PIRKLE et Francis S. MARKLAND Jr., éditeur : MARCEL DEKKER INC., New York, Basel, pages 335-348, ne dégradent ni ne détruisent les activateurs du plasminogène de type tissulaire et de type urokinase, d'une part, et leurs inhibiteurs PAI, d'autre part.

La nouvelle solution technique selon l'invention permet de pallier les inconvénients précités des méthodes de dosage antérieures sus-visées.

Selon un premier aspect de l'invention, on propose une nouvelle solution technique pour la détermination des activateurs du plasminogène et de leurs inhibiteurs qui met en oeuvre au moins un matériau métalloprotéinasique.

Selon un second aspect de l'invention, on préconise un procédé pour la détermination d'activateurs du plasminogène de type tissulaire (tPA) et de leurs inhibiteurs (PAI) dans lequel on utilise un matériau métalloprotéinasique.

Selon un autre aspect de l'invention, on préconise un nécessaire, trousse ou kit de dosage comprenant en tant que réactif au moins un matériau métalloprotéinasique.

OBJET DE L'INVENTION

On propose selon l'invention une nouvelle utilisation d'une substance inhibant les protéines plasmatiques α_2-antiplasmine et/ou α_2-macroglobuline dans le domaine du dosage des activateurs du plasminogène et des inhibiteurs desdits activateurs du plasminogène, ladite utilisation étant caractérisée en ce que ladite substance inhibant lesdites protéines plasmatiques est choisie parmi l'ensemble constitué par les matériaux métalloprotéinasiques.

On propose également selon l'invention un nouveau procédé pour la détermination (i) d'un activateur du plasminogène choisi parmi l'ensemble constitué par les activateurs du plasminogène de type tissulaire (tPA) et les activateurs du plasminogène de type urokinase (uPA), et (ii) d'un inhibiteur (PAI) dudit activateur du plasminogène, ledit procédé, qui comporte la transformation du plasminogène en plasmine puis le dosage de la

plasmine résultante de ladite transformation, étant caractérisé en ce qu'il comprend l'inhibition des protéines plasmatiques α_2-antiplasmine et/ou α_2-macroglobuline au moyen d'une substance choisie parmi l'ensemble constitué par les matériaux métalloprotéinasiques.

ABREVIATIONS

Par commodité, les abréviations suivantes ont été utilisées dans la présente description, à savoir :

a) <u>en ce qui concerne la fibrinolyse</u> :

α_2-AP	= α_2-antiplasmine
C1-Inh	= inhibiteur de la C1 estérase
α_2-M	= α_2-macroglobuline
tPA	= activateur du plasminogène de type tissulaire (en anglais : "tissue plasminogen activator")
sctPA	= activateur du plasminogène de type tissulaire de structure monocaténaire (en anglais : "single-chain tissue plasminogen activator"); autre nomenclature : tPA-I
tctPA	= activateur du plasminogène de type tissulaire de structure bicaténaire (en anglais : "two-chain tissue plasminogen activator); autre nomenclature : tPA-II
uPA	= activateur du plasminogène de type urokinase (en anglais : "urokinase plasminogen activator"); autres nomenclatures : urokinase ou activateur du plasminogène de type urinaire
scuPA	= activateur du plasminogène de type urokinase de structure monocaténaire (en anglais : "single-chain urokinase

plasminogen activator"); autre nomenclature : prourokinase

tcuPA = activateur du plasminogène de type urokinase de structure bicaténaire (en anglais : "two-chain urokinase plasminogen activator"); autres nomenclatures : urokinase de haut poids moléculaire ou HMW-UK

PAI = inhibiteur d'activateur du plasminogène

PAI-1 = inhibiteur 1 des activateurs du plasminogène, substance formant des complexes (tPA-PAI-1) et (uPA-PAI-1) avec tPA et respectivement uPA

PAI-2 = inhibiteur 2 des activateurs du plasminogène, substance formant des complexes avec tPA et uPA

PAI-3 = inhibiteur 3 des activateurs du plasminogène, substance susceptible de former des complexes avec uPA

UK = urokinase (autre nomenclature de uPA).

b) <u>en ce qui concerne les substrats peptidiques</u> :

Arg = arginyle

Abu = 2-aminobutyryle

CHA = 3-cyclohexylalanyle

CHT = 3-(4-hydroxycyclohexyl)alanyle

Glu = glutaminyle

Gly = glycyle

Hyp = hydroxyprolyle (3Hyp ou 4Hyp)

3Hyp = 3-hydroxyprolyle (ou 3-hydroxy-2-pyrrolidinecarbonyle)

4Hyp = 4-hydroxyprolyle (ou 4-hydroxy-2-pyrrolidinecarbonyle)

Leu = leucyle

Lys = lysyle

Nle = norleucyle

Nva = norvalyle
Phe = phénylalanyle
Phg = phénylglycyle
Pip = pipécolinoyle
Pro = prolyle
Pyr = pyroglutaminyle (ou 2-pyrrolidone-5-carbonyle)
Tyr = tyrosyle
Val = valyle

c) en ce qui concerne les autres abréviations :

AMCHA = acide tranexamique, de nomenclature systématique : acide 4-(aminométhyl)-cyclohexane-carboxylique
BSA = albumine bovine sérique
Bzl = benzyle
EACA = acide ε-aminocaproïque
EM = éthyloxymalonyle (EtO-CO-CH_2-CO)
Et = éthyle
Me = méthyle
MM = méthyloxymalonyle (MeO-CO-CH_2-CO)
OD = densité optique
OtBu = t-butyloxy
PEG_n = reste de polyéthylèneglycol de PM = n
PM = poids moléculaire
pNA = p-nitroanilino [ou (4-NO_2)C_6H_4NH]
RT = température ambiante (15-20°C)

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

Par l'expression "matériau métalloprotéinasique" on entend selon l'invention une substance constituée par une ou plusieurs métalloprotéinases ou une substance renfermant au moins une métalloprotéinase. Le matériau métalloprotéinasique qui intervient selon l'invention a pour objet d'annihiler, d'inhiber ou détruire les protéases plasmatiques que sont les α_2-AP et/ou α_2-M.

Parmi les matériaux métalloprotéinasiques qui conviennent selon l'invention, on peut notamment citer les venins. Les venins contenant au moins une métalloprotéinase peuvent être utilisés soit tels que recueillis notamment de serpents ou d'insectes, soit purifiés. Parmi les venins de serpent que l'on peut utiliser, on peut notamment citer ceux obtenus d'animaux appartenant aux familles des vipéridés et des crotalidés.

Le matériau métalloprotéinasique préféré selon l'invention est choisi parmi les produits qui clivent l'α_2-antiplasmine de poids moléculaire de l'ordre de 68 000 daltons pour donner un peptide qui est essentiellement dépourvu d'activité α_2-AP et a un PM de l'ordre de 53 000 daltons.

Les matériaux métalloprotéinasiques que l'on préconise de préférence selon l'invention sont constitués par les venins de Bitis arietans, Crotalus basiliscus et Lachesis muta (ou Lachesis mutus).

On sait que les ω-aminoacides tels que l'AMCHA et l'EACA favorisent la transformation du plasminogène en plasmine selon deux mécanismes : induction d'un changement de conformation du Glu-plasminogène en Lys-plasminogène plus activable en plasmine, et interférence sur l'interaction de la plasmine avec l'α_2-AP permettant de diminuer l'effet inhibiteur de la plasmine par l'α_2-AP d'au moins 10 fois.

On vient de trouver de façon surprenante que lesdits ω-aminoacides potentialisent l'effet recherché du matériau métalloprotéinasique sur l'α_2-AP et l'α_2-M, lorsque l'on fait appel à un plasma non épuisé en α_2-AP, en présence ou en absence de PAI. En revanche, il n'y a pas de potentialisation de l'effet dudit matériau métalloprotéinasique lorsque l'on fait appel à un plasma épuisé en α_2-AP, dès lors que, dans ce cas, la

génération de plasmine à partir du plasminogène est suffisamment importante avec ledit matériau métallo-protéinasique.

Dans le cas de la détermination ou du dosage de tPA, l'on recommande selon l'invention d'incorporer un stimulateur. Le stimulateur utilisable est ici un moyen classique de l'art antérieur, par exemple des monomères de fibrine commercialisés notamment sous le nom commercial de DESASIF [des-AA-fibrinogène] par la société BIOPOOL, des fragments de fibrinogène (voir l'article de VERHEIJEN précité) et commercialisés notamment par la société DIAGNOSTICA STAGO dans sa trousse de dosage STACHROM PA, ou une polylysine décrite notamment dans l'article de GYZANDER précité.

De façon avantageuse selon l'invention, l'on préconise pour la détermination ou le dosage de tPA d'utiliser une concentration de venin dans un tampon approprié supérieure ou égale à 0,025 mg/ml (correspondant à une teneur supérieure ou égale à 0,0125 mg/ml finale dans le mélange de l'essai). En pratique, la concentration maximale du venin dans le tampon sera inférieure ou égale à 1 mg/ml. De préférence, l'on utilisera plus avantageusement une concentration de venin dans le tampon de l'ordre de 0,05 mg/ml. Le tampon préféré sera un tampon phosphate de pH 7,0 à 9,0 et mieux un tampon phosphate de pH 7,5. Ledit tampon peut contenir de l'albumine bovine (BSA) pour favoriser la lyophilisation des réactifs devant être incorporés dans les trousses de dosage.

Pour le dosage ou la détermination de PAI, on préconise avantageusement d'utiliser une concentration de venin dans le plasma de 0,1 à 1 mg/ml, et de préférence une concentration de 0,24 mg/ml. Selon le meilleur mode de mise en oeuvre de l'invention, pour la détermination ou le dosage du tPA, (a) l'on incorpore du venin dans le

plasma à étudier dilué dans le tampon approprié, (b) incube à 37°C pendant 2 minutes, (c) ajoute le moyen stimulant (notamment le produit commercialisé sous le nom de STIMUGEN par la société DIAGNOSTICA STAGO), (d) incube à 37°C pendant 150 minutes, (e) ajoute le substrat chromogène, puis (f) incube à 37°C pendant 5 minutes. On effectue ensuite la lecture de la libération du moyen chromogène, notamment à 405 nm en cinétique selon la méthode statique dite à deux points (en ajoutant dans ce cas de l'acide acétique). La lecture de OD (notamment par transmission) est contrôlée par un essai à blanc dans lequel le plasma à étudier additionné de venin est remplacé par le tampon additionné de venin.

En variante, le venin peut être incorporé dans le système au stade (c) avec le moyen stimulant.

Toujours selon le meilleur mode de mise en oeuvre de l'invention, pour la détermination ou le dosage du PAI, (a) l'on incorpore tPA ou uPA dans le plasma à étudier, (b) incube à 37°C pendant 5 minutes, (c) ajoute un mélange constitué par du plasminogène, un ω-aminoacide (notamment AMCHA ou EACA) et du venin, (d) incube à 37°C pendant 3 minutes, (e) ajoute le substrat chromogène, puis (f) incube à 37°C pendant 3 minutes. On effectue ensuite la lecture de la libération du moyen chromogène, comme indiqué ci-dessus, notamment à 405 nm en cinétique selon la méthode dite à deux points (en ajoutant dans ce cas de l'acide acétique). La lecture de OD (notamment par transmission) est également contrôlée par un essai à blanc dans lequel le tPA ou l'uPA est remplacé par un tampon.

Parmi les substrats chromogènes synthétiques spécifiques de la plasmine, l'on peut utiliser notamment l'un des composés suivants :

H-D-Nva-L-CHA-L-Lys-pNA,

H-D-Abu-L-CHT-L-Lys-pNA,

H-D-Nle-L-CHA-L-Arg-pNA,
H-D-Phe-L-Pip-L-Arg-pNA,
H-D-Val-Leu-Lys-pNA,
MM-L-Phe-L-Arg-pNA,
MM-L-4Hyp-L-Arg-pNA,
MM-L-3Hyp-L-Arg-pNA,
MM-L-Tyr-L-Arg-pNA,
MM-L-Phg-L-Arg-pNA,
MM-L-Hyp-L-Lys-pNA,
MM-L-Pro-L-Lys-pNA,
MM-L-Tyr-L-Lys-pNA,
MM-L-Hyp(OtBu)-L-Arg-pNA,
EM-L-Pro-L-Arg-pNA,
EM-L-Tyr-L-Arg-pNA,
EM-L-Phe-L-Arg-pNA,
EM-L-Phg-L-Arg-pNA,
PEG_{200}[CO-D-Glu(OBzl)-L-Pro-L-Arg-pNA]$_2$,
PEG_{400}[CO-D-Leu-Gly-L-Arg-pNA]$_2$,

(les deux derniers substrats de cette liste étant décrits dans la demande de brevet français No 90 01964 de la Demanderesse) ou un de leurs sels d'addition d'acide, notamment avec HCl, l'acide acétique ou l'acidetrifluoroacétique comme acide salifiant.

Le nécessaire, trousse ou kit de dosage selon l'invention, comprendra au moins un matériau métalloprotéinasique de préférence choisi parmi les venins de Bitis arietans, Crotalus basiliscus, Lachesis muta et leurs mélanges, et le cas échéant, des échantillons tPA, uPA et/ou PAI purs.

La solution selon l'invention, qui met en oeuvre un matériau métalloprotéinasique pour inhiber les protéases plasmatiques α_2-AP et/ou α_2-M, convient pour le dosage des activateurs du plasminogène de type tissulaire et de type urokinase, et leurs inhibiteurs. La solution selon l'invention est plus particulièrement destinée au

dosage ou à la détermination de tPA et de son inhibiteur, le PAI.

EXEMPLE 1

- Protocole de dosage de tPA -

On procède selon le diagramme A ci-dessus dans un tube à hémolyse en matière plastique maintenu à la température de 37°C, selon les modalités données dans le tableau I ci-après.

TABLEAU I

DOSAGE DU tPA

Ingrédients	Essai	Blanc
Plasma dilué dans un tampon avec matériau métalloprotéinasique (a)	200 µl	-
Tampon plus matériau métalloprotéinasique (a)	-	200 µl
Incubation	2 minutes	2 minutes
Stimulant (b)	200 µl	200 µl
Incubation	150 minutes	150 minutes
Substrat (c)	200 µl	200 µl

Notes

(a) venin de B.arietans, C.basiliscus ou L.muta

(b) produit commercialisé sous le nom de STIMUGEN par la société DIAGNOSTICA STAGO

(c) substrat chromogène spécifique de la plasmine

Remarque

La lecture est faite avec un spectrophotomètre pour apprécier la libération du groupement chromogène à 405 nm.

EXEMPLE 2

- Dosage de PAI -

On procède selon le diagramme B ci-dessus dans un tube à hémolyse en matière plastique maintenu à la température de 37°C, selon les modalités données dans le tableau II ci-après.

TABLEAU II

DOSAGE DU PAI

Ingrédients	Essai	Blanc
Plasma	50 µl	50 µl
uPA ou tPA	200 µl	-
Tampon	-	200 µl
Incubation	5 minutes	5 minutes
Plasminogène plus (a) plus (b)	200 µl	200 µl
Incubation	3 minutes	3 minutes
Substrat (c)	200 µl	200 µl
Incubation	3 minutes	3 minutes

Notes

(a) venin de B.arietans, C.basiliscus ou L.muta

(b) ω-aminoacide (AMCHA ou EACA)

(c) substrat chromogène spécifique de la plasmine

Remarque

La lecture est faite avec un spectrophotomètre pour apprécier la libération du groupement chromogène à 405 nm.

EXEMPLE 3

- Effet du matériau métalloprotéinasique sur α_2-AP -

On a mesuré la teneur en α_2-AP d'un plasma normal au moyen de la trousse de dosage "STACHROM α_2-AP" commercialisée par la société DIAGNOSTICA STAGO, en présence ou en l'absence d'un matériau métalloprotéinasique constitué par du venin de B.arietans, C.basiliscus ou L.muta, la teneur en venin étant à une concentration supérieure ou égale à 0,50 mg/ml de plasma en tampon de dilution (soit une teneur supérieure ou égale à 0,0125 mg/ml du mélange contenant de la plasmine).

L'inhibition de l'α_2-AP mesurée avec quatre lots différents de venin de B.arietans, quatre lots différents de C.basiliscus et quatre lots différents de L. muta est obtenue pour des concentrations allant de 0,5 à 1 g/ml de plasma (soit 0,025 à 0,050 g/l de tampon) de B.arietans, d'une part, et pour la concentration de 0,5 mg/ml de plasma (soit 0,025 mg/ml de tampon) de C.basiliscus ou de L.muta, d'autre part.

Quand on dose l'α_2-AP d'un plasma normal (teneur en α_2-AP dite de 100 %) en présence d'un desdits venins, on trouve une teneur (relative) en α_2-AP d'environ 25 % (20 à 30 %), ce qui démontre une inhibition de l'α_2-AP par le matériau métalloprotéinasique contenu dans le venin de B.arietans, C.basiliscus ou L.muta.

Les résultats consignés dans la figure 2 ci-après dans le système OD en ordonnées (à 405 nm)/V (venin de B.arietans) en mg/ml en abscisses confirment l'inhibition de l'α_2-AP par ledit venin, la courbe 2A correspondant à un échantillon contenant le tampon et de la plasmine, la courbe 2B correspondant à un échantillon contenant le plasma et de la plasmine, la courbe 2C correspondant à un échantillon contenant le tampon sans plasmine.

EXEMPLE 4

- Effet du matériau métalloprotéinasique sur le plasminogène et la plasmine -

On a observé que le matériau métalloprotéinasique (notamment le venin de B.arietans, C.basiliscus ou L. muta) n'a pas d'effet sur le plasminogène et qu'il n'a pas d'effet statistiquement significatif sur la plasmine. En particulier lorsque l'on ajoute le matériau métalloprotéinasique à de la plasmine puis incube à 37°C, on constate que le matériau métalloprotéinasique est capable d'hydrolyser les substrats synthétiques spécifiques de la plasmine [notamment les substrats CBS 30.41 et CBS 10.65, qui sont respectivement les H-D-Abu-L-CHA-L-Lys-pNA,AcOH et MM-Hyp-Arg-pNA,AcOH]. Cette hydrolyse est fonction de la concentration en venin; quand on utilise une concentration en venin relativement faible (0,0125 mg/ml de milieu), 95 % de la plasmine est active sur le substrat : l'effet du venin sur la plasmine est alors statistiquement non significatif.

EXEMPLE 5

- Effet du matériau métalloprotéinasique sur uPA et tPA -

On a observé que l'activité de uPA (urokinase) directement mesurée sur un substrat spécifique n'est pas modifiée en présence de venin (voir figure 3).

On a également observé que l'activité du tPA mesurée par STACHROM PA n'est pas modifiée en présence de venin (voir figure 4).

Dans la figure 3, selon le système OD en ordonnées (à 405 nm)/V (venin de B.arietans) en mg/ml en abscisses, les courbes 3A (uPA à 100 UI/ml), 3B (uPA à 40 UI/ml) et 3C (tampon seul) sont approximativement des droites.

Dans la figure 4, selon le système OD en ordonnées (à 405 nm)/tPA (dans le tampon) en UI/ml en abscisses, les courbes 4A (tampon contenant 0,24 mg/ml de

venin de B.arietans), 4B (tampon contenant 0,50 mg/ml de venin de B.arietans) et 4C (tampon sans venin) sont des droites pratiquement confondues.

EXEMPLE 6

- Effet du matériau métalloprotéinasique sur PAI -

On a observé que, lorsqu'un plasma riche en PAI est incubé en présence d'un matériau métalloprotéinasique (venin de B.arietans, C.basiliscus ou L.muta), l'activité du PAI telle que dosée est identique à celle trouvée dans ledit plasma en l'absence dudit matériau métalloprotéinasique (voir figure 5).

On a également observé que, lorsque l'on ajoute du tPA purifié au mélange plasma-matériau métalloprotéinasique (venin de B.arietans, C.basiliscus ou L.muta), le tPA ajouté est totalement inhibé par le PAI du plasma en l'absence et en présence dudit matériau métalloprotéinasique (voir figure 6).

L'ensemble de ces résultats met clairement en évidence que, selon l'invention, le matériau métalloprotéinasique n'inhibe pas le PAI.

Dans la figure 5, selon le système OD en ordonnées (à 405 nm)/PAI en UI/ml en abscisses, les courbes 5A (PAI en l'absence de venin de B.arietans) et 5B (PAI en présence de venin de B.arietans) sont des droites parallèles.

Dans la figure 6, selon le système OD en ordonnées (à 405 nm)/venin (de B.arietans) en mg/ml en abscisses, le tPA a été ajouté à un plasma PO (teneur en PAI de 0 UI/ml) déplété en PAI ou à un plasma P1 (teneur en PAI de 7,7 UI/ml) riche en PAI, en présence de concentrations croissantes en venin de 0 à 0,50 mg/ml. La courbe 6A (plasma PO sans tPA) est une droite qui est approximativement parallèle à la droite 6B (tampon PO plus tPA 5,2 UI/ml). Les droites 6C (plasma P1 sans tPA) et 6D (plasma P1 plus tPA 5,2 UI/ml) sont identiques; ce-

ci indique que le tPA ajouté au plasma (P1) riche en PAI est inhibé en l'absence ou en présence de venin.

EXEMPLE 7

- Effet du matériau métalloprotéinasique sur les complexes uPA-PAI -

On a apprécié l'éventuelle interaction du matériau métalloprotéinasique (venin de B.arietans brut, tel que recueilli et fourni par les fermes d'élevage) sur les complexes uPA-PAI formés par incubation avec l'uPA (urokinase) à 37°C pendant 0,25 h d'un plasma riche en PAI (plasma P2 contenant du PAI à la concentration de 10 UI/ml) par comparaison avec le plasma PO épuisé en PAI utilisé à l'exemple 6.

Les résultats obtenus avec le venin de B.arietans ont été consignés dans les tableaux III et IV ci-après. Lesdits résultats montrent qu'il n'y a pas de formation de complexe dans le plasma PO car il n'y a pas de PAI : on retrouve donc tout l'uPA résiduel; comme le plasma P2 contient 10 UI/ml de PAI, il y a formation de complexes avec l'uPA et l'on ne retrouve qu'une partie de l'uPA ajouté. Ces résultats montrent également que le venin n'a pas d'effet sur la dissociation des complexes uPA-PAI et tPA-PAI.

EXEMPLE 8

- Effet du matériau métalloprotéinasique et de l'AMCHA sur la transformation du plasminogène en plasmine par l'uPA ou le tPA -

En premier lieu, on a vérifié que l'AMCHA, oméga-aminoacide de référence, augmente la génération de plasmine dans le dosage de PAI en présence d'urokinase (voir les résultats donnés dans la figure 7).

Dans la figure 7, selon le système OD en ordonnées (à 405 nm)/PAI en UI/ml en abscisses, les courbes obtenues : 7A (sans AMCHA), 7B (AMCHA à 1,3 mmoles/1 dans le réactif) et 7C (AMCHA à 2,6 mmoles/1 dans le réactif),

sont des droites et montrent que l'AMCHA augmente effectivement la transformation du plasminogène en plasmine.

En deuxième lieu, on a voulu vérifier que l'AMCHA diminue l'effet de l'α_2-AP d'un plasma normal (c'est-à-dire un plasma ayant une teneur en α_2-AP de 100 %). Selon la méthode "STACHROM α_2-AP" précitée, on a constaté que le taux d'α_2-AP est en moyenne de 30 % à une concentration de 0,88 mmole/l de tampon de dilution.

En troisième lieu, comme le venin brut (venin de B.arietans) est capable d'inhiber l'α_2-AP du plasma, soit directement soit en interférant sur l'interaction α_2-AP - plasmine, on a recherché si cet effet est potentialisé par l'AMCHA selon les modalités suivantes.

Dans le dosage d'α_2-AP par "STACHROM α_2-AP", on trouve une teneur d'α_2-AP inférieure à 5 % dans un plasma incubé en présence de venin et d'AMCHA ajoutés simultanément. Cette observation permet de conclure que l'AMCHA potentialise l'effet du venin sur l'inhibition de l'α_2-AP.

Dans le dosage de PAI, on trouve que le venin a un effet très important sur l'augmentation de la génération de plasmine et que cet effet est supérieur à celui de l'AMCHA (voir tableaux V,VI et VII ci-après). On constate que l'effet du venin est potentialisé par l'AMCHA en présence ou en l'absence de PAI (voir lesdits tableaux V, VI et VII).

Lorsque l'on utilise un plasma déficient en α_2-AP, la génération de plasmine est importante avec le venin, et elle l'est encore plus avec l'AMCHA. Ce résultat est lié à la transformation du Glu-plasminogène en Lys-plasminogène, et on constate que l'AMCHA dans ce cas ne potentialise pas le venin (voir tableau VIII ci-après).

EXEMPLE 9

- Effet du matériau métalloprotéinasique sur l'α_2-M -

On sait que les substances telles que l'EACA stimulent in vitro la génération de thrombine dans un plasma alors que l'effet de l'α_2-M est inhibé [cf. I.G.SLOAN et al., Thromb. Res., 44, pages 761-769, (1986)]. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que les oméga-aminoacides tels que l'EACA et l'AMCHA possèdent un groupe amine terminal et sont capables d'inhiber l'α_2-AP par ce groupe amine terminal dès lors que des composés comme la méthylamine sont connus pour agir de cette façon.

On sait, d'autre part, qu'il a été signalé que certains venins perdent leur activité protéolytique quand ils sont incubés avec l'α_2-M. Mais on sait aussi que la complexation de l'α_2-M avec les protéinases de venin peut être retardée en présence de substrat de protéinases telles que l'α_2-M [voir l'article de L.F.KRESS précité].

Compte tenu de ces circonstances, on a voulu vérifier si oui ou non un matériau métalloprotéinasique tel qu'un venin (venin brut de B.arietans) en association le cas échéant avec un oméga-aminoacide (AMCHA) pouvait intervenir favorablement dans le dosage de PAI. Dans cette optique, on a mesuré la plasmine résiduelle après inhibition par l'aprotinine. On a observé que :

- l'aprotinine (0,1 TIU/ml) inhibe la plasmine purifiée mais pas le venin,
- la plasmine générée en présence d'aprotinine est environ de 3 % dans un système tamponné,
- la teneur en plasmine générée en milieu plasmatique et liée à l'α_2-M est inférieure à 5 %, même en l'absence d'α_2-AP.

Il en résulte que l'interférence de l'α_2-M est donc négligeable, même en l'absence d'α_2-AP.

Les résultats qui ont été obtenus sont consignés dans les tableaux IX et X ci-après. Le tableau IX est relatif à la mesure de la plasmine générée en présence d'urokinase (uPA), d'une part, en présence ou en l'absence d'aprotinine, d'autre part, dans un plasma normal en α_2-AP mais déplété en PAI. Le tableau X est relatif à la mesure de la plasmine générée en présence d'urokinase, d'une part, en présence ou en l'absence d'aprotinine, d'autre part, dans un plasma déplété en α_2-AP.

EXEMPLE 10

- Conditions optimales du dosage de tPA -

Les conditions optimales pour le dosage de tPA sont obtenues avec des concentrations de venin (de préférence venin brut de B.arietans tel que recueilli et fourni par les fermes d'élevage) :

- supérieures à 0,0125 mg/ml dans le mélange réactionnel (c'est-à-dire à des concentrations supérieures à 0,025 mg/ml dans le tampon),

- et plus préférentiellement, de l'ordre de 0,025 mg/ml dans le mélange réactionnel (i.e. 0,050 mg/ml dans le tampon),

quel que soit le lot de venin.

La génération de plasmine optimale est obtenue en 2,50 h pour une gamme de tPA allant de 0 à 4 UI/ml, en tubes de verre ou de plastique. La courbe d'étalonnage obtenue est linéaire (voir courbe 8A de la figure 8). La courbe obtenue avec un plasma riche en tPA et dilué en plasma déplété en tPA et PAI est également linéaire (voir courbe 8B de la figure 8).

La figure 8 a été obtenue selon le système OD en ordonnées (à 405 nm)/tPA en UI/ml en abscisses.

Les résultats observés sur des plasmas obtenus après stase veineuse sont similaires, en présence de venin, à ceux observés sur des euglobulines en l'absence de venin (voir tableau XII ci-après).

Avant stase veineuse, les résultats sont plus élevés sur les euglobulines car la mesure du tPA est évaluée avec les autres activateurs du plasminogène, surtout ceux de la voie dépendante du Facteur XII. Ces autres activateurs sont activés pendant la fabrication des euglobulines.

EXEMPLE 11

- Conditions optimales du dosage de PAI -

Les conditions optimales de dosage du PAI sont obtenues avec des concentrations :

- d'uPA de 10 à 50 UI/ml (de préférence 10 UI/ml), ou de tPA (selon le dosage au moyen de "STACHROM PAI"),
- de plasminogène de 1 à 4 U/ml (de préférence 3 U/ml) de mélange réactionnel, quel que soit le lot de plasminogène,
- d'AMCHA de 0,4 à 4 mmoles/l (de préférence 0,8 mmole/l) de mélange réactionnel, ou de tout autre oméga-aminoacide,
- de venin (de préférence venin brut de B.arietans) de 0,1 à 1 mg/ml de plasma et mieux 0,24 mg/ml de plasma,
- de substrat (spécifique de la plasmine) de 1 à 5 micromoles/ml de plasma et mieux de 3,5 micromoles/ml de plasma.

Dans ces conditions, la génération de plasmine optimale est obtenue en 3 minutes et l'hydrolyse du substrat est réalisée en 3 minutes. La courbe d'étalonnage réalisée avec un plasma déplété en PAI [plasma dans lequel la teneur en PAI est nulle (PAI = 0 UI/ml)] et un plasma riche en PAI (PAI = 7,7 UI/ml) est linéaire. Voir à cet effet la figure 9. Dans la figure 9, selon le système OD en ordonnées (à 405 nm)/PAI en UI/ml en abscisses, les droites 9A, 9B, 9C et 9D ont été obtenues avec respectivement quatre lots différents de venin de B. arietans.

Les résultats observés sur des plasmas normaux et des plasmas pathologiques (femmes enceintes et patients post-opératoires) sont similaires à ceux trouvés par la technique "STACHROM PAI". Les unités sont exprimées en UI/ml d'urokinase pour le PAI en présence de venin et en UI/ml de tPA pour le PAI par la technique "STACHROM PAI" (voir tableau XI). On constate toutefois une petite différence chez les femmes enceintes car le PAI-2 a une activité anti-uPA supérieure à l'activité anti-tPA (voir plasma F).

UTILISATION DES REACTIFS

Pour la mise en oeuvre de l'invention, l'on recommande d'utiliser les réactifs selon les modalités suivantes :

- Dosage de tPA

On utilisera :

- les réactifs de la trousse de dosage "STACHROM PA" de la société DIAGNOSTICA STAGO,
- un matériau métalloprotéinasique (constitué par du venin de serpent) lyophilisé seul ou lyophilisé avec le "STIMUGEN".

La reconstitution du flacon est donc identique à celle décrite dans la notice "STACHROM PA". Les excipients de lyophilisation du matériau métalloprotéinasique sont ceux décrits pour le "STIMUGEN".

- Dosage de PAI

On utilisera :

- tPA : réactif de la trousse de dosage "STACHROM PAI" de la société DIAGNOSTICA STAGO,
- uPA (urokinase) : 20 UI/flacon, à reprendre par 2 ml d'eau distillée,
- excipients de lyophilisation : tampon phosphate (100 mM; pH 9,0) et BSA à 5 g/l,
- conservateur : gentamicine 50 mg/l,

- réactif, à reprendre par 2 ml d'eau distillée :
  - 1 volume de plasminogène purifié en tampon phosphate à pH 7,5,
  - 3 volumes de matériau métalloprotéinasique (venin de serpent) à la concentration de 0,15 mg/ml dans de l'eau distillée,
  - 2 volumes d'AMCHA à 4 mmoles/l dans un diluant contenant un tampon phosphate (50 mM; pH 7,5), 3 % de glycine et 0,9 % de NaCl (conservateur : gentamicine à 50 mg/l),
- substrat : 16,5 micromoles/flacon à reprendre par 2 ml d'eau distillée, en excipient glycine classique,
- plasma étalon ou contrôle lyophilisé dans un milieu comprenant 3 % de glycine, 1 % de lactose, 1 % de saccharose et 50 mg/l de gentamicine.

TABLEAU III

Dosage de uPA

uPA ajouté (UI/ml)	Sur Plasma PO uPA résiduel (UI/ml)		Sur plasma P2 uPA résiduel (UI/ml)	
	Théorique	Trouvé	Théorique	Trouvé
20	20	20	10	10
28	28	27	18	16,2
35	35	32	25	23,2

TABLEAU IV

Dosage de PAI

uPA ajouté (UI/ml)	PAI (UI/ml) Sur plasma PO		PAI (UI/ml) Sur plasma P2	
	Théorique	Trouvé	Théorique	Trouvé
20	0	0	10	10
28	0	1	2	1,8
35	0	3	0	1,8

TABLEAU V

Dosage de PAI (ΔOD)
sur plasma PO (PAI = 0 UI/ml)

	Sans AMCHA	AMCHA (4 mmoles /1)	AMCHA (8 mmoles/1)
Sans venin	57	709	724
Venin (0,25 mg/ml)	776	1012	944
Venin (0,50 mg/ml)	625	1030	931

TABLEAU VI

Dosage de PAI (ΔOD)
sur plasma P3 (PAI = 8 UI/ml)

	Sans AMCHA	AMCHA (4 mmoles /1)	AMCHA (8 mmoles/1)
Sans venin	33	473	538
Venin (0,25 mg/ml)	452	663	614

2661920

TABLEAU VII

Dosage de PAI (OD_{P3} - OD_{PO})

	Pente obtenue		
	Sans AMCHA	AMCHA (4 mmoles /1)	AMCHA (8 mmoles/1)
Sans venin	24	236	186
Venin (0,25 mg/ml)	324	349	330

2661920

TABLEAU VIII

Dosage de PAI (ΔOD)
sur plasma déficient en α_2-AP

	Sans AMCHA	AMCHA (8 mmoles /1)
Sans venin	433	1 505
Avec Venin (0,25 mg/ml)	1 345	1 468

2661920

TABLEAU IX

ΔOD	TAMPON		PLASMA PO (PAI = 0 UI/ml)	
	sans aprotinine	avec aprotinine	sans aprotinine	avec aprotinine
Avec venin	852	23 (2,7 %)	257	0 (0 %)

2661920

TABLEAU X

ΔOD	TAMPON		PLASMA DEFICIENT en α_2-AP	
	sans aprotinine	avec aprotinine	sans aprotinine	avec aprotinine
Sans venin	1 764	216 (12 %)	1 645	181 (11 %)
Avec venin	1 774	231 (13 %)	> 2.0	279 -

TABLEAU XI

Plasmas	PAI (UI/ml)	
	STACHROM PAI	Urokinase et venin
A	0	0
B	0	0,2
C	18,3	6,0
D	18,7	6,5
E	23,2	8,5
F	16,6	7,9

2661920

TABLEAU XII

Echantillon	tPA (UI/ml)	
	euglobulines en absence de venin	Plasma en présence de venin
Pool normal	< 0,1	< 0,1
Plasma G avant stase veineuse	< 0,88	< 0, 1
Plasma G après stase veineuse	3,6	3,7

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'une substance inhibant les protéines plasmatiques α_2-antiplasmine et/ou α_2-macroglobuline dans le domaine du dosage des activateurs du plasminogène et des inhibiteurs desdits activateurs du plasminogène, ladite utilisation étant caractérisée en ce que ladite substance inhibant lesdites protéines plasmatiques est choisie parmi l'ensemble constitué par les matériaux métalloprotéinasiques.

2. Utilisation suivant la revendication 1, caractérisée en ce que ledit matériau métalloprotéinasique est associé à au moins un ω-aminoacide.

3. Procédé pour la détermination (i) d'un activateur du plasminogène choisi parmi l'ensemble constitué par les activateurs du plasminogène de type tissulaire (tPA) et les activateurs du plasminogène de type urokinase (uPA), et (ii) d'un inhibiteur (PAI) dudit activateur du plasminogène, ledit procédé, qui comporte la transformation du plasminogène en plasmine puis le dosage de la plasmine résultante de ladite transformation, étant caractérisé en ce qu'il comprend l'inhibition des protéines plasmatiques α_2-antiplasmine et/ou α_2-macroglobuline au moyen d'une substance choisie parmi l'ensemble constitué par les matériaux métalloprotéinasiques.

4. Procédé suivant la revendication 3, caractérisé en ce que le matériau métalloprotéinasique est choisi parmi les produits qui clivent l'α_2-antiplasmine de poids moléculaire de l'ordre de 68 000 daltons pour donner un peptide qui est essentiellement dépourvu d'activité α_2-AP et a un poids moléculaire de l'ordre de 53 000 daltons.

5. Procédé suivant la revendication 3, caractérisé en ce que le matériau métalloprotéinasique est choisi parmi les venins.

6. Procédé suivant la revendication 3, caractérisé en ce que le matériau métalloprotéinasique est choisi parmi les venins de serpent appartenant à la famille des vipéridés et des crotalidés.

7. Procédé suivant la revendication 6, caractérisé en ce que le matériau métalloprotéinasique est choisi parmi les venins de Bitis arietans, Crotalus basiliscus et Lachesis muta.

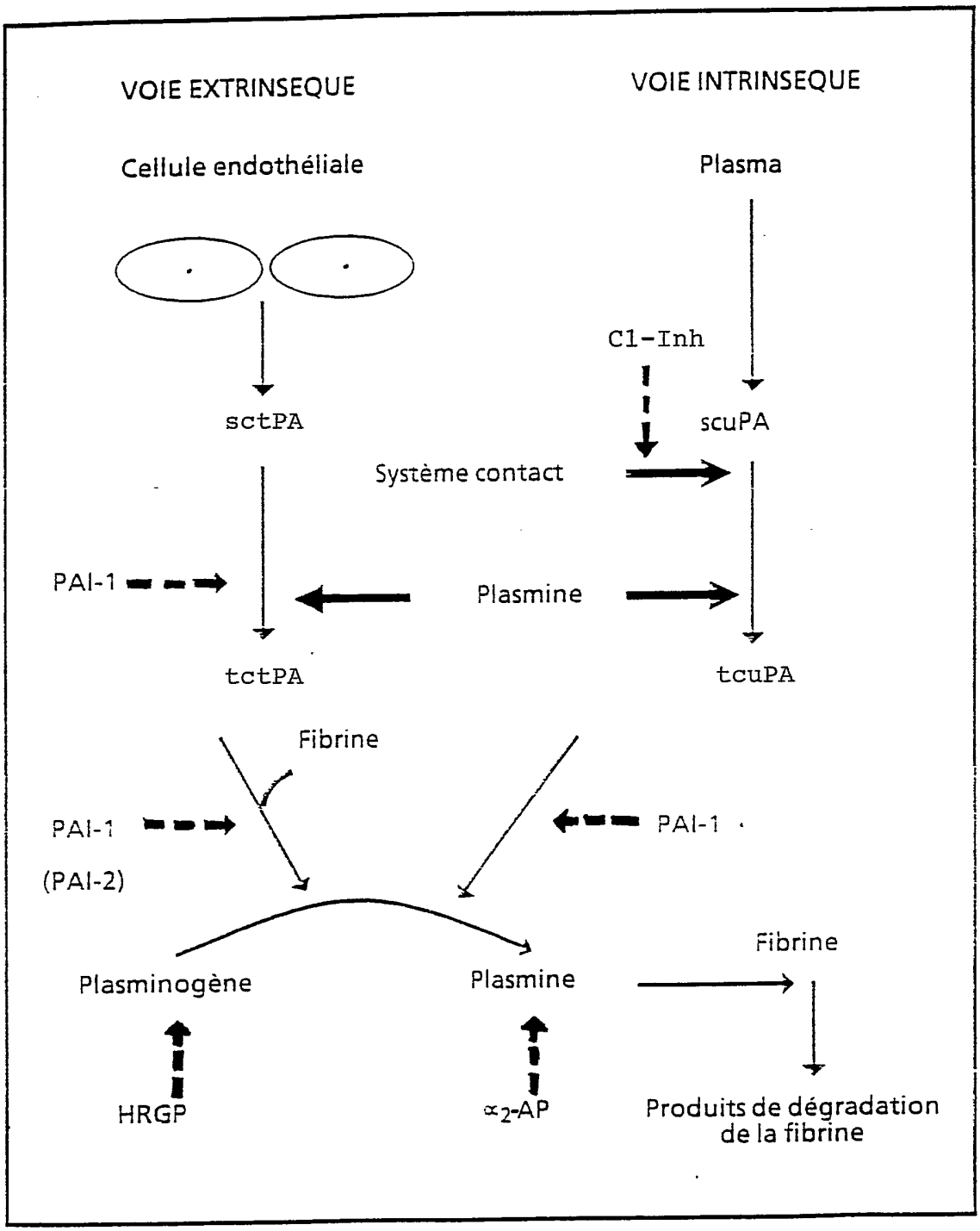
8. Procédé suivant la revendication 3, caractérisé en ce que pour la détermination du tPA, (a) l'on incorpore le matériau métalloprotéinasique dans le plasma à étudier dilué dans le tampon approprié, (b) incube à 37°C pendant 2 minutes, (c) ajoute un moyen stimulant la transformation du plasminogène en plasmine , (d) incube à 37°C pendant 150 minutes, (e) ajoute le substrat chromogène spécifique de la plasmine, puis (f) incube à 37°C pendant 5 minutes, la lecture de la densité optique correspondante à la libération du moyen chromogène étant ensuite effectuée notamment par comparaison avec un essai à blanc dans lequel le plasma à étudier additionné de matériau métalloprotéinasique du stade (a) est remplacé par un tampon additionné de matériau métalloprotéinasique.

9. Procédé suivant la revendication 8, dans lequel le matériau métalloprotéinasique est incorporé au stade (c) au lieu du stade (a).

10. Procédé suivant la revendication 3, caractérisé en ce que pour la détermination du PAI, (a) l'on incorpore tPA ou uPA dans le plasma à étudier, (b) incube à 37°C pendant 5 minutes, (c) ajoute un mélange constitué par du plasminogène, un ω-aminoacide et ledit matériau métalloprotéinasique, (d) incube à 37°C pendant 3 minutes, (e) ajoute le substrat chromogène spécifique de la plasmine, puis (f) incube à 37°C pendant 3 minutes, la lecture de la densité optique correspondante à la libération du moyen chromogène étant ensuite effectuée notamment par comparaison avec un essai à blanc dans lequel au stade (c) l'activateur du plasminogène (tPA ou uPA) est remplacé par un tampon.

11. Nécessaire pour la détermination d'un activateur du plasminogène de type tissulaire ou de type urokinase, d'une part, ou d'un inhibiteur d'activateur du plasminogène, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un matériau métalloprotéinasique.

Fig. 1


VOIE EXTRINSEQUE
VOIE INTRINSEQUE
Cellule endothéliale
Plasma
C1-Inh
sctPA
scuPA
Système contact
PAI-1
Plasmine
tctPA
tcuPA
Fibrine
PAI-1
PAI-1
(PAI-2)
Fibrine
Plasminogène
Plasmine
HRGP
α_2-AP
Produits de dégradation de la fibrine

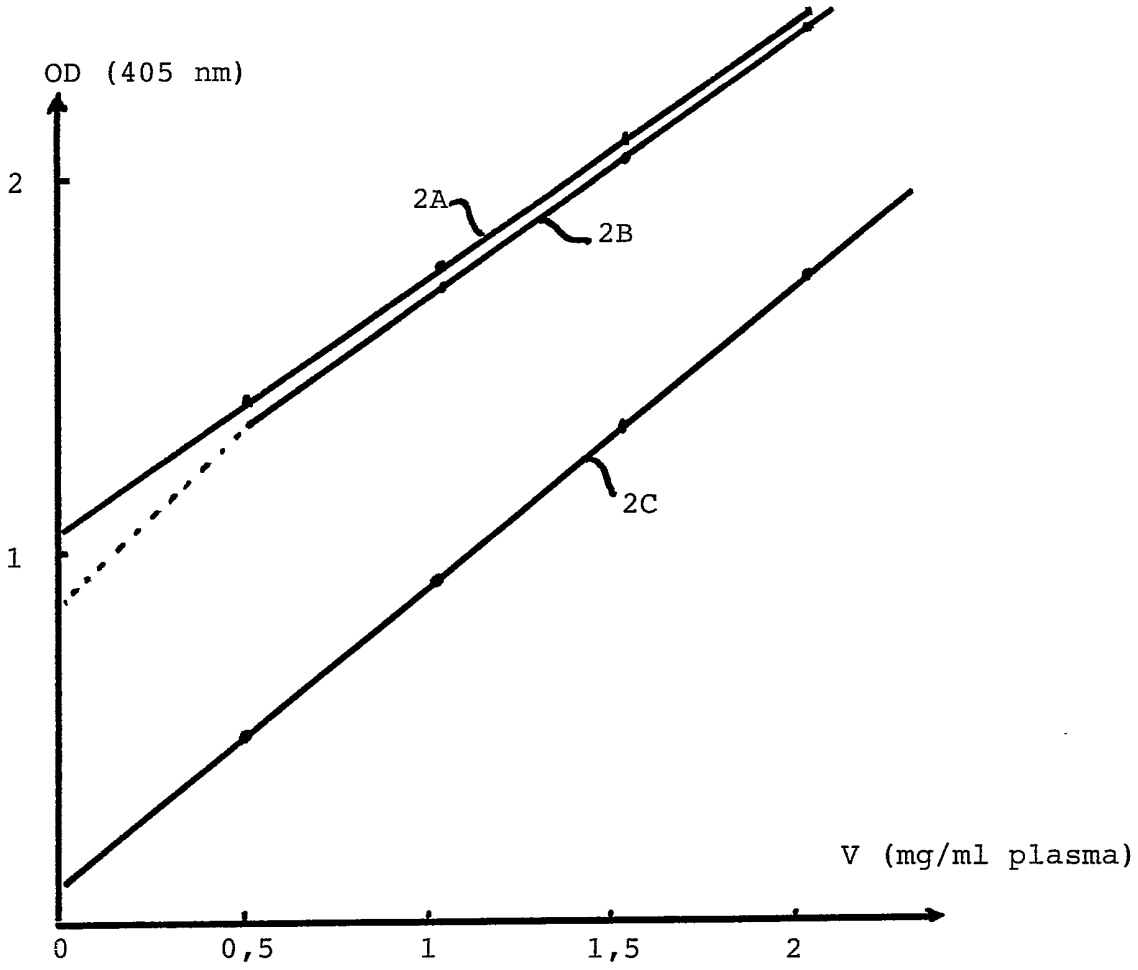


Fig. 2

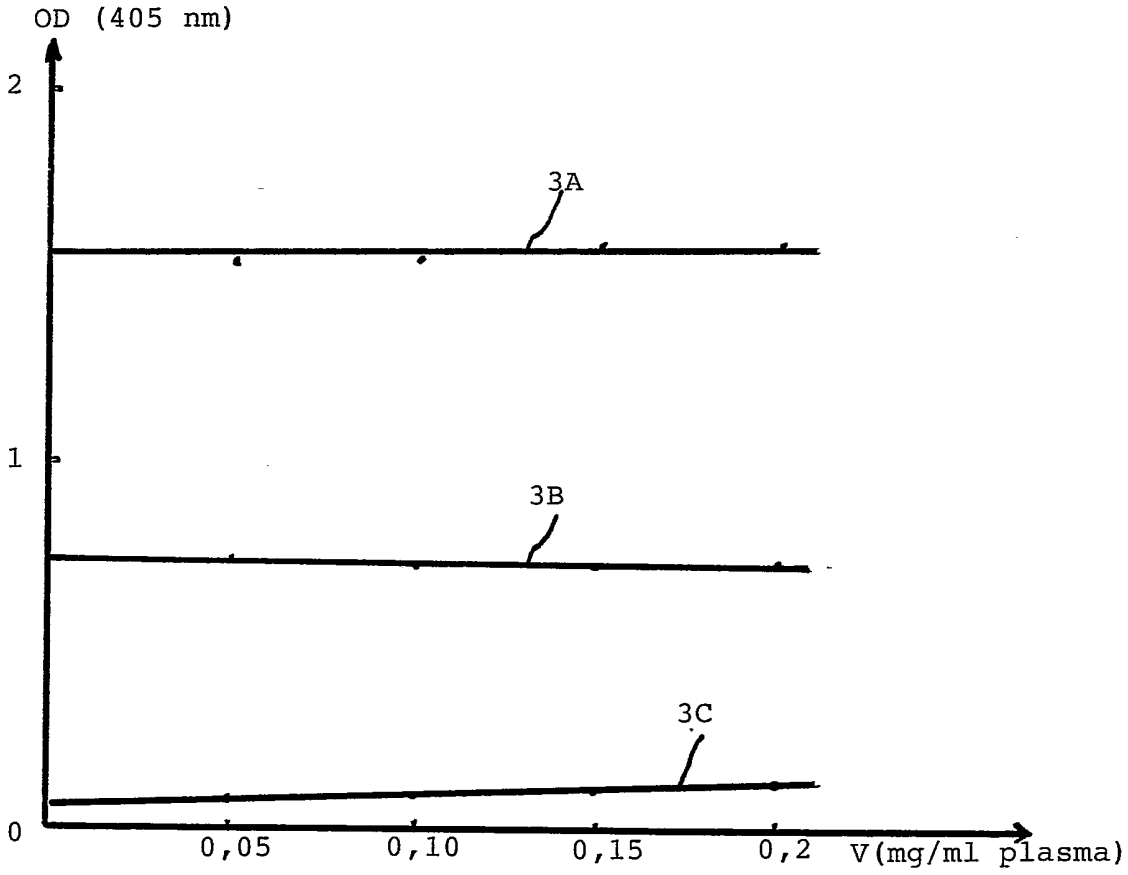


Fig. 3

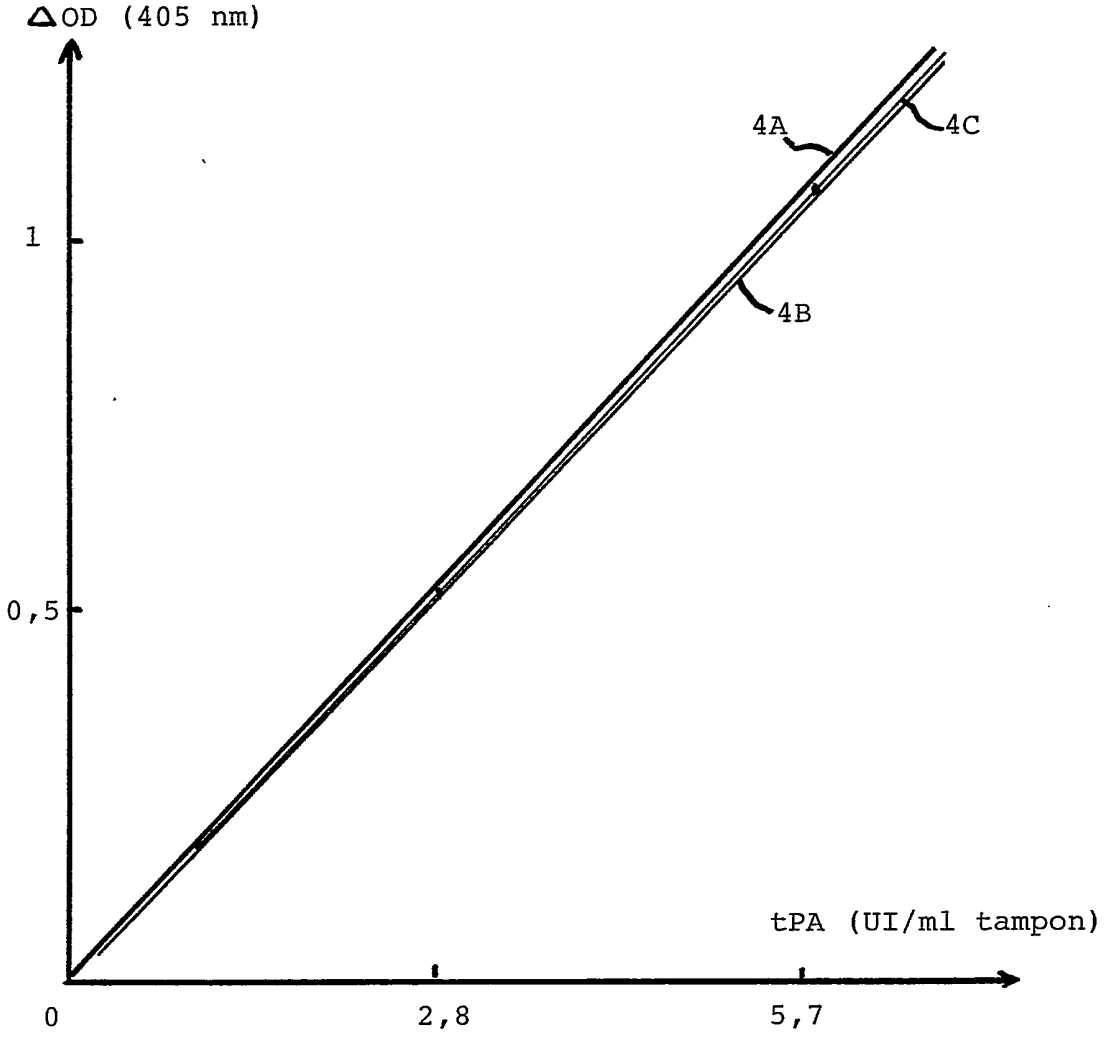


Fig. 4

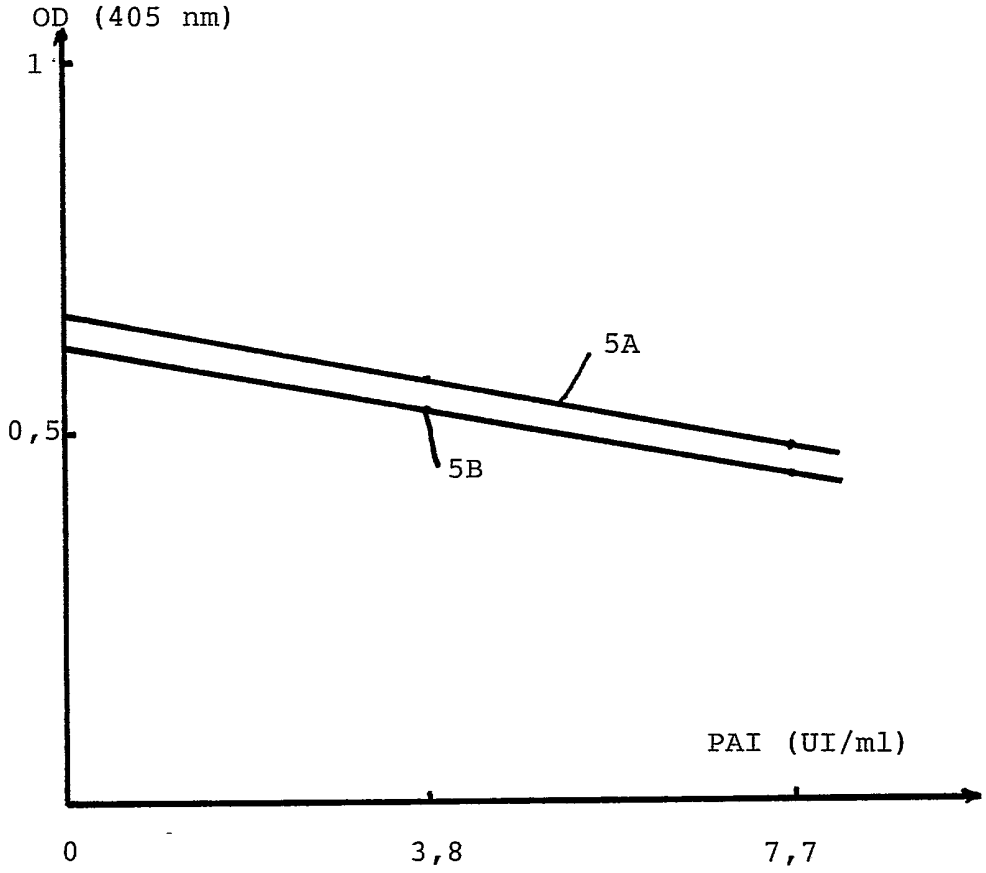

OD (405 nm)
1
0,5
5A
5B
PAI (UI/ml)
0
3,8
7,7

Fig. 5

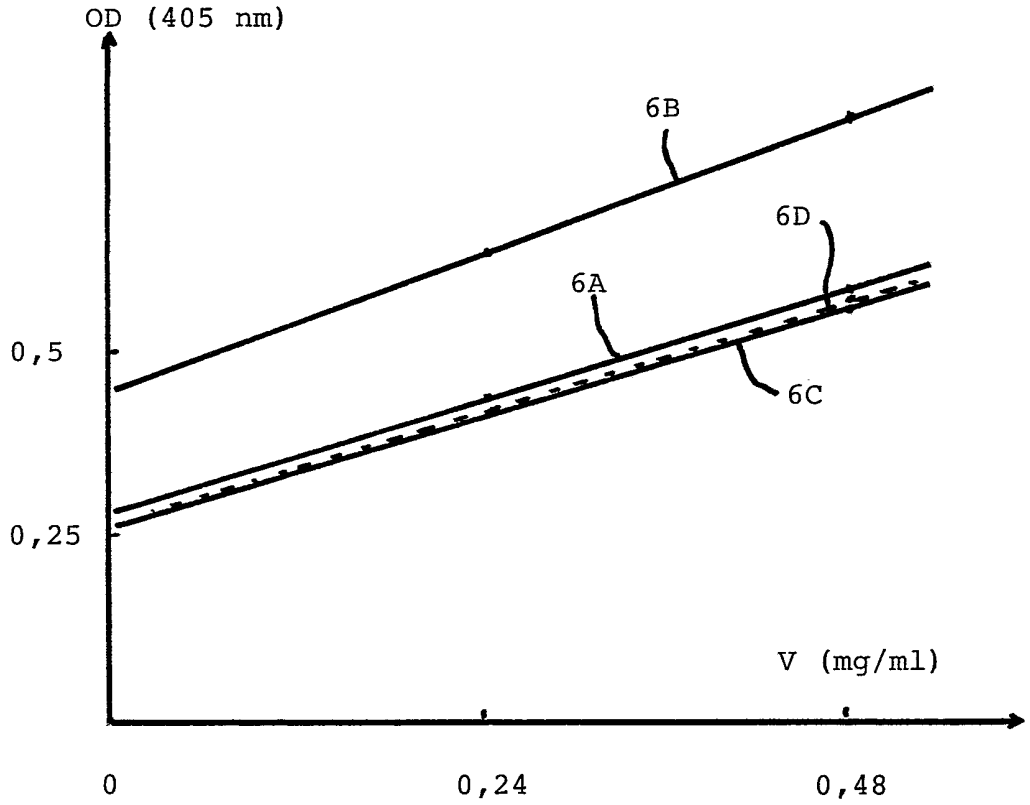

OD (405 nm)
6B
6D
6A
6C
0,5
0,25
V (mg/ml)
0
0,24
0,48

Fig. 6

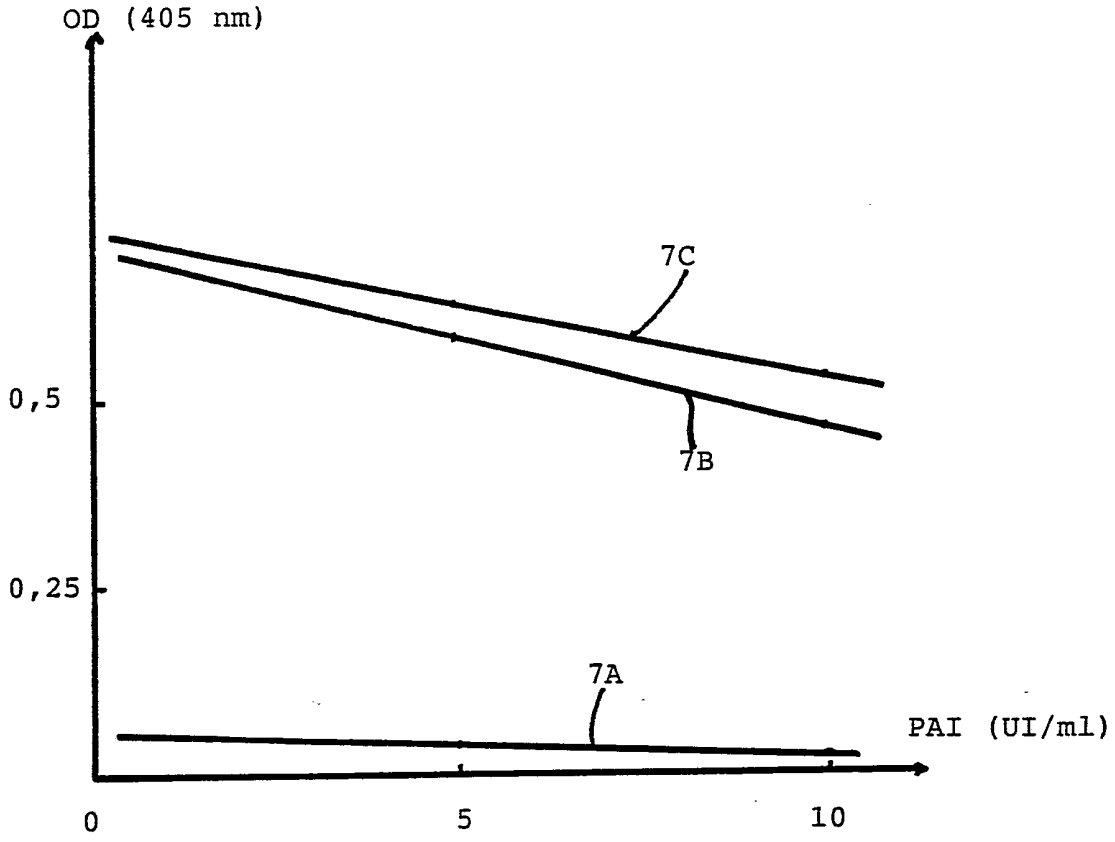

OD (405 nm)
7C
0,5
7B
0,25
7A
PAI (UI/ml)
0
5
10

Fig. 7

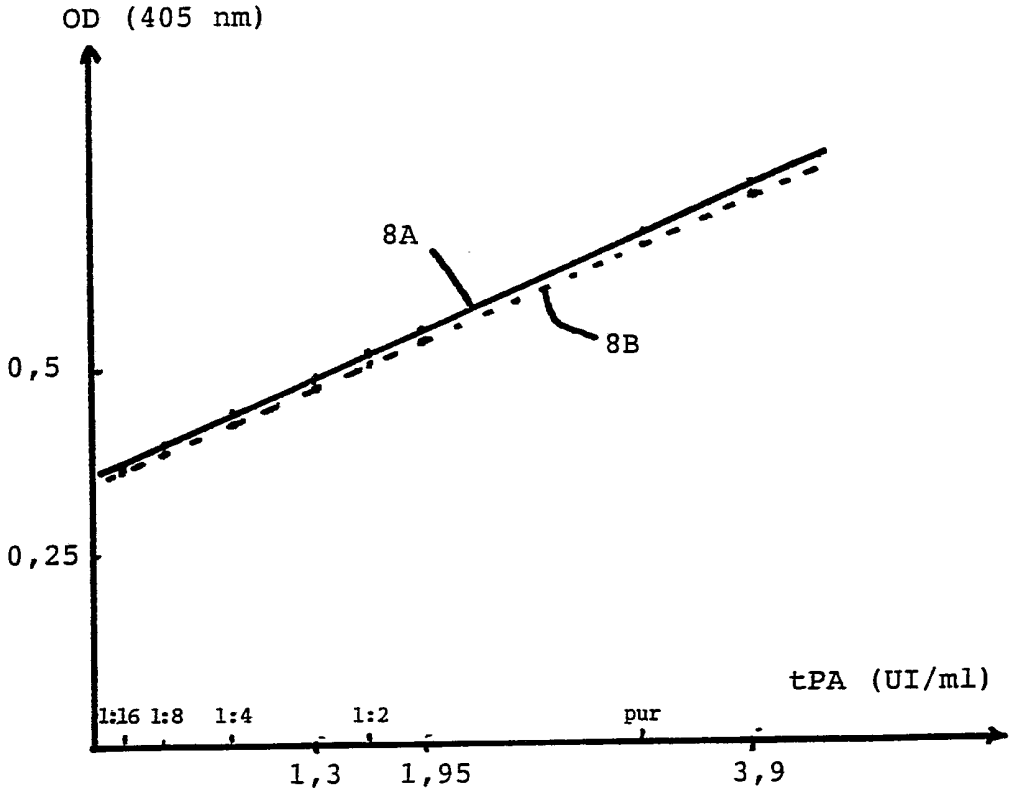

OD (405 nm)
8A
8B
0,5
0,25
tPA (UI/ml)
1:16
1:8
1:4
1:2
pur
1,3
1,95
3,9

Fig. 8

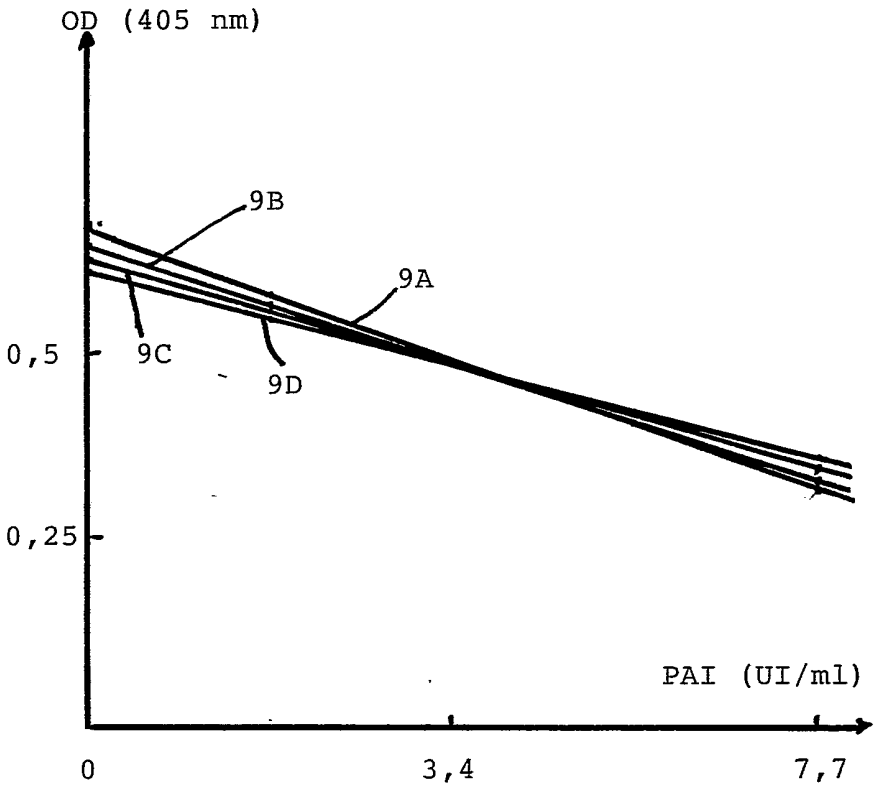


Fig. 9

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

2661920

N° d'enregistrement national

FR 9005808
FA 442712

RAPPORT DE RECHERCHE

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendications concernées de la demande examinée
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 107, no. 21, 23 novembre 1987, page 336, abrégé no. 193596h, Columbus, Ohio, US; J. AMIRAL et al.: "Laboratory assay for coagulation protein C", & THROMB. HEMORRH. DIS., PROC. INT. MEET. DANUBIAN LEAGUE THROMB. HAEMORRH. DIS., 4TH 1985 (PUB. 1986), 125-31 ---	1-11
Y	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 71, no. 4, 1981, abstract no. 21854, Biological Abstracts Inc., Philadelphia, PA, US; L.F. KRESS et al.: "Enzymatic inactivation of human antithrombin III: Limited proteolysis of the inhibitor by snake venom proteinases in the presence of heparin", & BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 615(1): 178-186. 1980 -----	1-11

DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)

C 12 Q 1

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
25-01-1991	VAN BOHEMEN C.G.

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

X : particulièrement pertinent à lui seul
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie
A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général
O : divulgation non-écrite
P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons

& : membre de la même famille, document correspondant

EPO FORM 1503 03.82 (P0413)