

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 81 08681

(54)

Médicament nouveau constitué par un complexe aprotinine-plasmine et procédé de préparation de ce nouveau complexe.

(51)

Classification internationale (Int. Cl. ³). C 07 C 103/52; A 61 K 37/02.

(22)

Date de dépôt 30 avril 1981.

(33) (32) (31)

Priorité revendiquée :

(41)

Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.F.I. -- « Listes » n° 44 du 5-11-1982.

(71)

Déposant : Société dite : CHOAY SA, résidant en France.

(72)

Invention de : Edmond Vairel.

(73)

Titulaire : *Idem* (71)

(74)

Mandataire : Cabinet Orès,
6, av. de Messine, 75008 Paris.

La présente invention est relative à un produit nouveau constitué par un complexe aprotinine-plasmine et plus particulièrement aprotinine-lys plasmine humaine et à l'utilisation de ce complexe nouveau en tant que médicament, notamment en tant que thrombolytique.

5 L'aprotinine est un inhibiteur naturel compétitif d'un certain nombre d'endopeptidases, extrait d'organes de bovins tels que poumons, pancréas, parotides, dans lesquels il est présent dans les microsomes cellulaires. Son activité d'inhibition, en particulier vis-à-vis de la trypsine,
10 de la kallikréine et de la plasmine, a permis son utilisation en thérapeutique, notamment dans les fibrinolyse cataclysmiques en raison de son activité antiplasmine.

L'Inventeur (cf. VAIREL E.G., ANTOINE G., Ann. Anesth. Franç., 1963, IV, n° spécial, 23) a pu démontrer
15 que tout syndrome fibrinolytique est déclenché par une coagulation intravasculaire ; or, comme on le sait, une telle fibrinolyse est sous la dépendance de la plasmine, enzyme protéolytique formée à partir d'un précurseur plasmatique, le plasminogène, laquelle dégrade la fibrine qui
20 constitue le caillot, en petits fragments solubles. Ainsi, la plasmine présente dans le sang circulant provoque la fibrinolyse du caillot. Or, l'aprotinine est un anti-fibrinolytique qui exerce une action d'inhibition de la fibrinolyse, en sorte que l'on aurait pu s'attendre à ce
25 que son administration bien connue en thérapeutique, entraîne des phénomènes de coagulation intravasculaire. Or, ce n'est pas le cas : l'aprotinine est très largement utilisée dans le traitement des pancréatites, sans provoquer le développement de syndromes de coagulation intravasculaire, bien
30 que l'on observe dans tous les cas une hypercoagulation accompagnée d'une hyperfibrinolyse. De même, l'Inventeur a montré [VAIREL E.G., HUREAU J., Ann. Pharm. Franç., 1973, 31 (6), 409] que l'accélération de la coagulation par injection, chez le chien, de kaolin ou de de trypsine, n'est
35 pas modifiée par l'administration d'aprotinine et que l'on n'observe généralement pas de phénomène de coagulation

intravasculaire. Par contre, l'administration d'acide epsilon-amino-caproïque, qui est un inhibiteur synthétique de la fibrinolyse, à la place de l'aprotinine, provoque la mort rapide des animaux d'expérience, par infarctus
5 cardiovasculaire massif, ce qui tendrait à démontrer que cet inhibiteur synthétique s'opposerait à la fibrinolyse aussi bien qu'à la fibrinogénolyse, alors que l'aprotinine ne serait, in vivo, inhibiteur que de la fibrinogénolyse (le fibrinogène étant, comme on le sait, le précurseur de
10 la fibrine, et étant transformé en cette dernière sous l'action de la thrombine), son action antifibrinolytique s'expliquant par son action d'inhibition de la plasmine avec laquelle elle forme in situ un complexe enzyme-inhibiteur, considéré dans la Littérature comme étant
15 dénué d'activité aussi bien vis-à-vis du fibrinogène que de la fibrine.

Des complexes plasmine-aprotinine ont été préparés dans l'Art antérieur [cf. "The Journal of Biological Chemistry, vol. 250, n° 10, 25 Mai 1975, p. 3988-3995,
20 L. SUMMARIA, L. ARZADON, P. BERNABE et K.C. ROBBINS : "The activation of Plasminogen to Plasmin by Urokinase in the presence of the Plasmin inhibitor trasylol" et "Thrombosis Research, 17, p. 143-152, B. WIMAN : "on the reaction of plasmin or plasmin-streptokinase complex
25 with aprotinin or α_2 -antiplasmin"] ; toutefois, ces complexes ont essentiellement été préparés dans le but, pour l'équipe de SUMMARIA et Alia, de démontrer qu'il ne se produit pas de clivages importants des liaisons peptidiques dans la fraction qui comporte un $-NH_2$ terminal, des Glu-
30 plasminogènes humains ou de lapin et dans le Asp-plasminogène de chat ou dans le X-plasminogène de chien, pendant l'activation par des quantités catalytiques d'Urokinase dans 25 % de glycérol, en présence de "Trasylol" (dénomination commerciale de l'aprotinine Bayer).
35 Le but recherché par B. WIMAN a été, par exemple, d'étudier la cinétique de la réaction d'inactivation de la

plasmine par l'aprotinine par la formation d'un complexe présent au cours d'une première étape de la réaction, sous une forme réversible et, au cours d'une deuxième étape, sous une forme modifiée, également réversible, à partir
5 d'un mélange de plasmine avec un excès (60 %) d'aprotinine par rapport à la plasmine. SUMMARIO et Alia ont confirmé, dans leur étude précitée, que les complexes plasmine-aprotinine sont inactifs en tant qu'enzymes. Aucune de ces publications n'a envisagé la possibilité d'une utilisation
10 de ces complexes en thérapeutique, le but clairement visé de leurs Auteurs étant de tenter d'expliquer des mécanismes biochimiques en utilisant la propriété de l'aprotinine d'inhiber la plasmine in situ, à l'aide de modèles formés in vitro.

L'Inventeur a à présent mis en évidence que le
15 complexe aprotinine-plasmine n'est pas inerte vis-à-vis de la fibrine, dans certaines conditions, et que, de ce fait, il peut être utilisé en tant que nouveau médicament fibrinolytique.

En effet, contrairement à ce que l'on croyait être
20 le comportement du complexe qui se formerait in situ entre l'aprotinine et la plasmine et que l'on considérerait comme tout à fait inerte tant vis-à-vis de la fibrine que du fibrinogène, l'Inventeur a pu établir que le produit nouveau conforme à l'invention n'est inerte que vis-à-vis du
25 fibrinogène et ne l'est pas vis-à-vis de la fibrine.

De plus, il est connu que les α_2 antiplasmines contenues dans le plasma sont capables d'inhiber les deux-tiers environ de la plasmine pouvant être générée dans le plasma, à l'égard de laquelle ils jouent le rôle d'inhibiteurs natu-
30 rels présents dans le sang circulant ; de ce fait, il faut, pour que la fibrinolyse puisse se produire, que l'on ait abaissé le taux d' α_2 antiplasmines jusqu'à un certain point, afin de permettre à la plasmine de jouer son rôle vis-à-vis de la fibrine, ce qui a pour effet une consommation très importante du plasminogène circulant, ce qui né-
35 cessite de pourvoir à un apport externe de plasmine ou de

plasminogène. Or, alors que la plasmine présente dans le sang circulant est inhibée par les α_2 antiplasmines, l'Inventeur a pu établir que lorsque la plasmine est complexée avec l'aprotinine conformément à l'invention, elle
5 est inerte vis-à-vis des α_2 antiplasmines, ce qui fait que l'apport de plasmine nécessaire à la fibrinolyse est considérablement réduit et que cette dernière est susceptible d'exercer immédiatement son action.

La présente invention a donc pour objet un médicament nouveau constitué par un complexe aprotinine-plasmine.
10

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, le médicament nouveau est constitué par un complexe aprotinine-lys plasmine humaine.

15 Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, l'aprotinine et la plasmine sont présentes dans le complexe dans un rapport aprotinine/plasmine de 2/1.

La présente invention a également pour objet un nouveau procédé de préparation du complexe aprotinine-plasmine, lequel consiste à mettre en contact de la
20 plasmine ou son précurseur, le plasminogène associé à un activateur, avec de l'aprotinine, en quantités appropriées, dans un solvant convenable, le complexe aprotinine-plasmine formé étant purifié par passage sur
25 une colonne de Sépharose-lysine, de manière à éliminer l'excès éventuel d'aprotinine et le cas échéant l'activateur si celui-ci a été précédemment ajouté et le complexe étant ensuite élué par l'acide ϵ -amino-caproïque à une concentration molaire d'au moins 0,05.

30 Selon un mode de réalisation avantageux du procédé qui fait l'objet de la présente invention, dans le cas où l'on met en oeuvre le précurseur de la plasmine, à savoir le plasminogène, celui-ci est un plasminogène partiellement pré-activé tel que celui qui a été décrit
35 dans le Brevet CHOAY n° 73 45289 déposé le 18 Décembre 1973

et publié sous le n° 2 254 316.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux du procédé qui fait l'objet de la présente invention, l'activateur associé au plasminogène est l'urokinase.

5 Selon un autre mode de réalisation avantageux du procédé qui fait l'objet de la présente invention, le mélange d'aprotinine et de plasmine comprend au moins 3500 à 5000 UIP d'aprotinine pour 1 microkatal de plasmine, et avantageusement 3600 à 4000 UIP d'aprotinine
10 pour 1 microkatal de plasmine.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux du procédé qui fait l'objet de la présente invention, la complexation de l'aprotinine et de la plasmine est réalisée par incubation d'un mélange d'aprotinine et de plasmine, ou de plasminogène associé à un activateur, à une
15 température comprise entre l'ambiante et 40°C.

Selon une disposition particulière de ce mode de réalisation, dans le cas où l'on utilise le plasminogène associé à un activateur, la durée de l'incubation est suffisante - de l'ordre d'une heure environ -, pour provoquer la transformation du plasminogène en plasmine et la complexation de cette dernière avec l'aprotinine, ce temps pouvant être réduit à quelques minutes dans le cas où l'on met en oeuvre la plasmine.
20

25 Conformément à l'invention, le pH du mélange est de l'ordre de $7,4 \pm 0,4$.

Les différents paramètres ci-dessus indiqués, c'est-à-dire concentration des produits en présence, température, pH, durée d'incubation, sont ajustés les uns aux autres en vue d'obtenir le complexe désiré. Comme il est bien connu dans ce type de réaction, ces différents paramètres sont généralement en relation directe les uns avec les autres et il est clair que la modification de l'un de ces facteurs conduit à l'ajustement des autres
30
35 en conséquence.

Egalement conformément à l'invention, le complexe formé conformément à l'invention, est lyophilisé.

La Demanderesse a pu mettre en évidence que le complexe aprotinine-plasmine conforme à l'invention se fixe sur la fibrine, une certaine quantité d'aprotinine se trouve alors libérée et entraînée dans le plasma. Le complexe ainsi modifié par la fibrine possède alors des propriétés fibrinolytiques qui s'exercent directement sur le support fibrine en l'hydrolysant. Cette modification a été démontrée, conformément à l'invention, par le dosage de l'activité inhibitrice de l'aprotinine sur la trypsine, selon la méthode de la Pharmacopée française, d'une part directement et, d'autre part, dans le surnageant trichloracétique 5 % dont la plasmine précipitée est éliminée.

On constate :

- 1°) l'absence d'une activité inhibitrice directe du complexe sur la trypsine ; la totalité de l'inhibiteur engagé dans le complexe peut être retrouvée dans le surnageant trichloracétique de la solution du complexe ;
- 2°) en présence de fibrine, le complexe acquiert une activité inhibitrice directe sur la trypsine, ce qui montre une libération partielle d'aprotinine. De plus, le surnageant du précipité trichloracétique de l'ensemble (fibrine, fibrinopeptides, complexe et aprotinine libre), permet de retrouver dans le surnageant la totalité de l'aprotinine engagée dans le complexe.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre.

L'invention vise plus particulièrement le médicament nouveau conforme à l'invention, ainsi que le procédé et les moyens mis en oeuvre pour sa préparation et

son utilisation.

L'invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de préparation du complexe conforme à l'invention, de dosage de l'aprotinine libérée du complexe, ainsi qu'à un compte-rendu d'expérimentations relatives à l'activité pharmacologique du nouveau complexe conforme à l'invention.

Il doit être bien entendu toutefois que ces exemples de préparation et de dosage et ce compte-rendu d'expérimentations sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1

On mélange :

- Lys-plasminogène	30 microkatala
- Aprotinine	300 000 UIP
- Urokinase	6 000 UCTA

dans 2 ml de solution tampon phosphaté 0,15 M, pH 7,4.

Le plasminogène activé par la streptokinase ou l'urokinase est dosé par son activité estérolytique sur l'ester méthylique de la N- α -acétyl glycyl-L-lysine (AGLME) : l'unité 1 microkatal est l'activité enzymatique qui hydrolyse une mole de substrat par seconde à 30°C - pH 8,10.

On incube pendant une heure.

Sur une colonne de lysine-Sépharose (Pharmacia) de 9 mm de diamètre et 14 cm de long, équilibrée avec le tampon phosphate, on effectue une chromatographie d'affinité du mélange incubé.

L'excès d'aprotinine et l'urokinase, non retenus sur le support, sont présents dans un premier pic (1) représenté à la figure unique du dessin annexé, qui apparaît dès l'écoulement d'un volume égal à celui de la colonne.

Le complexe aprotinine-plasmine est élué par le tampon phosphate additionné de 0,05 M d'acide ϵ -aminocaproïque (cf. flèche 3). Il apparaît dans un pic étroit (2), représentant dans cet essai, 6 ml d'éluat.

5 Cet éluat est débarrassé de l'acide ϵ -aminocaproïque par dialyse. Le dialysat est lyophilisé.

EXEMPLE_2

On mélange :

10 - Lys-plasmine 800 mg
- Aprotinine 64 mg
dans 5 ml d'eau distillée.

On fait incuber 5 mn à température ambiante.

On lyophilise et on obtient environ 850 mg du complexe aprotinine-plasmine, soit un rendement pratiquement quantitatif.

EXEMPLE_3

a) formation du complexe :

On mélange :

20 - Lys-plasmine (titrant 2 μ Katals/mg) 100 g
- Aprotinine (titrant 50 000 uIP/mg) 8,8 g

On incube dans les mêmes conditions qu'à l'Exemple 2 et on lyophilise ; on obtient environ 100 g du complexe.

b) purification du complexe :

25 On procède comme indiqué à l'Exemple 1, mais avec une colonne de taille adaptée.

CARACTERISATION DU PRODUIT

- Le nouveau complexe conforme à l'invention présente les caractéristiques physico-chimiques suivantes :

30 . son poids moléculaire après filtration sur "ULTROGEL" est de l'ordre de 90 000 ;

. sa constante d'association, calculée par FRITZ H., SCHULT H., MEISTER R., WERLE E. - Z. Physiol. Chem., 1969, 350, 1531, est égale à 3×10^8 .

35 - Le complexe peut être en partie dissocié en

présence de fibrine, ainsi qu'il est décrit plus loin et acquiert, du fait de sa dissociation partielle, des propriétés fibrinolytiques.

- Les caractéristiques biologiques du complexe conforme à l'invention, sont les suivantes :

- . il est inactif vis-à-vis du fibrinogène, en milieu plasmatique,
- . il est inactif vis-à-vis d'un excédent de plasmine.

Dosage de l'aprotinine libérée du complexe

On dose l'aprotinine libérée du complexe, en procédant comme décrit ci-après, dans le but de déterminer la quantité d'aprotinine fixée par microkatal de plasmine, dans le complexe conforme à l'invention.

a) On forme le complexe aprotinine-plasmine conforme à l'invention à partir :

- . de 25 microkats de Lys-plasminogène humain dont l'activité a été préalablement mesurée,
- . d'urokinase,
- . et d'un excès d'aprotinine (cf. Exemple 1 ci-dessus) ;

on incube pendant une heure à 37°C.

On filtre sur une colonne de lysine-Sépharose qui retient le complexe, tandis que l'excès d'aprotinine et l'urokinase, qui ne sont pas retenus sur le support, s'écoulent de la colonne.

Le complexe aprotinine-lys plasmine humaine obtenu, est élué par de l'acide ϵ -amino-caproïque, puis dialysé pour éliminer ce dernier.

b) On dissout le complexe obtenu dans du sérum physiologique ;

c) on ajoute à cette solution, de l'acide trichloracétique concentré en quantité suffisante pour obtenir une concentration finale d'acide trichloracétique de 5 % dans la solution de complexe. Il se forme un précipité contenant la plasmine décomplexée, lequel est éliminé

10

par centrifugation.

On recueille le surnageant, qui contient l'aprotinine ;
on ajuste le pH à 8, puis on dose l'aprotinine présente
dans le surnageant, par inhibition de l'action de la
5 trypsine sur BAEE, à 253 nm, suivant la méthode de la
Pharmacopée Française.

Le dosage montre que 100 000 UIP d'aprotinine ont été
libérées du complexe, soit environ 4000 uIP par micro-
katal de plasmine.

10 COMPTE-RENDU D'EXPERIMENTATIONS DEMONTRANT L'ACTIVITE
PHARMACOLOGIQUE DU COMPLEXE CONFORME A L'INVENTION

1°) Comportement du complexe aprotinine-plasmine
au contact de la fibrine

500 mg de fibrinogène humain (Kabivitrum) sont
15 dissous dans 80 ml de tampon Tris- ClH, pH 7,4, 0,05 M
contenant 0,01 % de mercurothiolate de sodium ; 20 ml de
plasma humain citraté sont ajoutés à cette solution (ap-
port de facteur XIII).

Sous agitation, sont ajoutés 100 NIH de thrombine
20 (Roche) dissous dans 10 ml de solution de Cl_2Ca M/20.
Après 20 minutes d'incubation à 37°C, la fibrine est re-
cueillie par centrifugation, puis mise en suspension dans
500 ml du tampon Tris par dispersion mécanique (Ultraturax).
Après agitation de 15 minutes, la fibrine est recueillie
25 par centrifugation à + 10°C et remise en suspension dans
500 ml de tampon et agitée de la même manière que précé-
demment. Ce lavage est éventuellement répété afin d'obte-
nir une fibrine insensible à l'urokinase Choay ou à la
streptokinase Behring (à 1 ml de suspension de fibrine,
30 0,1 ml de solution de SK à 1000 UI/ml ou 0,1 ml d'UK à
1000 UCTA/ml est ajouté ; aucune dissolution ne doit être
observée après incubation d'une heure à 37°C).

La totalité de la fibrine est alors dispersée
mécaniquement dans 50 ml de tampon. Cette suspension sert

à constituer une colonne de 15 cm de long et de 0,9 cm de diamètre. Cette colonne est alimentée en continu par une pompe, l'effluent est analysé par un lecteur U.V. avant d'être distribué par un collecteur de fractions
5 (matériel LKB). L'équilibre de la colonne est obtenu par passage de la solution tampon Tris sous un débit de 10 ml/heure pendant 2 heures.

2°) Comportement du complexe aprotinine-lys plasmine humaine vis-à-vis de la fibrine en milieu tampon

10 2 ml de la solution du complexe inactif correspondant à 8 microkats de plasmine et additionnés de 50 000 uIP d'aprotinine en excès, sont déposés au sommet de la colonne de fibrine, puis un débit de 10 ml/heure de tampon est appliqué.

15 Résultats

Un pic apparaît entre le 10ème et le 16ème ml d'effluent ; il contient uniquement l'aprotinine ajoutée en excès en même temps que la dissolution du sommet de la colonne est observée, dissolution qui est complète après 90 minutes.
20

Ceci prouve que l'aprotinine n'est pas adsorbée sur la fibrine et qu'à partir du moment où seul le complexe se trouve en présence de fibrine, la dissolution de cette dernière est observée.

25 Si au début de l'observation de la lyse, le tampon est additionné de 0,05 M d'acide ϵ -amino-caproïque, la dissolution de la fibrine ne se poursuit pas et le complexe, comme décrit plus loin, est élué de la fibrine ; il apparaît dans un pic assez large.

30 En remplaçant la fibrine comme support par le Sépharose-lysine défini par DEUTSCH D. et MERTZ E.T. - Science 1970, 170, 1095 pour la purification du plasminogène, on observe que le complexe aprotinine-plasmine est retenu sur la colonne de Sépharose-lysine, alors que
35 l'aprotinine en excès est éliminée ; l'excès d'aprotinine

est présent dans l'éluat frontal et le complexe est élué par l'acide ϵ -amino-caproïque. Cette observation a été utilisée pour le développement du procédé de préparation du complexe conforme à l'invention tel que décrit à l'Exemple 1 ci-dessus.

Conclusions

Le complexe aprotinine-plasmine, dont la constante d'association est très forte, 3×10^8 (FRITZ H., SCHULT H., MEISTER R., WERLE E. - Z. Physiol. Chem., 1969, 350, 1531), est partiellement dissocié en présence de fibrine. Tout se passe comme si le complexe aprotinine-plasmine transformé comme décrit plus loin, formait un complexe transitoire avec la fibrine.

3°) Comportement du complexe aprotinine-plasmine en milieu plasmatique humain

A/ Mise en évidence de l'action lytique sur la fibrine

La colonne de fibrine étant réalisée comme précédemment, 20 ml de plasma humain citraté dilués au 1/2 avec le tampon Tris ont servi à équilibrer la colonne sous un débit de 12,5 ml/heure.

2 ml de la solution du complexe inactif correspondant à 8 microkatal de plasmine, sont additionnés de 50 000 uIP d'aprotinine en excès, puis mélangés à 100 ml de plasma humain citraté dilué au 1/2 avec la solution tampon. Ce mélange a été passé sur la colonne de fibrine avec un débit de 12,5 ml/heure, puis 300 ml de plasma dilué au 1/2 ont été passés.

Résultats

a) L'inhibiteur se libère beaucoup plus lentement que dans le premier cas considéré et il faut attendre le passage de 50 ml de plasma d'élution pour qu'il soit complètement élué.

b) la fibrinolyse débute après que 100 ml de plasma d'élution soient passés au travers de la colonne. Cette lyse se poursuit, mais se limite à la moitié de la

colonne. Ceci peut être dû à l'intervention des α_2 anti-plasmines présentes en large excès dans le plasma. Il peut être également supposé qu'après 48 heures, la plasmine soit dégradée.

5 Conclusions

 L'expérience réalisée en milieu plasmatique démontre que le complexe aprotinine-lys-plasmine humaine est également dissocié en milieu plasmatique humain et qu'il exerce son action fibrinolytique, ce qui permet d'envisager son utilisation comme thérapeutique spécifique de choix des coagulations intravasculaires.

10 B/ Mise en évidence de la libération d'aprotinine en milieu plasmatique

 a) On fait transiter le complexe aprotinine-plasmine conforme à l'invention comprenant 10 microkatal de plasmine et 40 000 uIP d'aprotinine (1 microkatal pour 4 000 uIP), en solution dans 50 ml de plasma dilué au 1/2, à travers une colonne remplie de fibrine. Le complexe se fixe sur le caillot de fibrine.

20 b) On fait alors transiter à travers la colonne du plasma humain citraté, dilué au 1/2 et ne contenant pas de complexe.

 Ce plasma dilué au 1/2, ayant transité au travers de la colonne, additionné de 25 u de streptokinase par ml et coagulé par la thrombine, donne un caillot dont le temps de lyse est de l'ordre de 5 mn.

 Ce même plasma ayant transité au travers de la colonne de fibrine chargée de complexe, additionné de la même manière de 25 u de streptokinase/ml et coagulé par la thrombine, donne un caillot dont le temps de lyse est supérieur à 35 mn.

 Ceci montre que le plasma, en transitant au travers de la colonne s'est chargé d'inhibiteur, augmentant ainsi le temps de lyse.

35 Cette expérimentation illustre clairement que le

complexe aprotinine-plasmine ne devient actif en tant que fibrinolytique qu'en présence de fibrine et après libération d'une partie de l'aprotinine initialement complexée dans le milieu plasmatique, ce qui met en évidence les deux formes sous lesquelles le complexe se présente, à savoir : - une forme stable inactive dans laquelle l'aprotinine est présente dans une proportion de 2/1 par rapport à la plasmine et une forme active, dans laquelle le rapport aprotinine-plasmine s'est abaissé, une partie de l'aprotinine ayant été libérée dans le plasma, en présence de fibrine.

4°) Etude de la durée de la présence du complexe aprotinine-plasmine dans le sang circulant après injection intraveineuse au lapin

A. Le potentiel fibrinolytique du sang est étudié en utilisant une des méthodes d'étude des fibrinolytiques; celle-ci est décrite page 274 et suivantes par E.G. VAIREL dans "Progress in Chemical fibrinolysis and thrombolysis", vol. 1, édité par J.F. Davidson, M.M. Samama et P.C. Desnoyers - Raven Press - New York.

Le sang citraté (1/20 de citrate de sodium à 9%) est centrifugé pour obtenir un plasma pauvre en plaquettes.

Le plasma citraté est recalcifié et on introduit aussitôt 0,5 ml dans le tube central à fond poreux, alors qu'en même temps, on obtient le même niveau dans le tube externe, avec une solution tampon pH 7,4, 0,15 mg. Les tubes sont maintenus à 37°C. Après coagulation ferme, le lavage est obtenu par addition de tampon à 37°C dans le tube externe ; la différence de niveau obtenue fait que le tampon pénètre au travers du caillot de bas en haut, et réalise son lavage. Le liquide de lavage après avoir traversé le caillot, est éliminé par siphonnage. Ce lavage peut être arrêté après 3 heures. Les tubes sont maintenus à 37°C.

Après 24 heures, un caillot constitué à partir de sang normal n'a subi aucune modification ; un caillot constitué à partir de sang contenant du complexe aprotinine-plasmine conforme à l'invention a subi une dissolution
5 partielle ou totale.

L'observation de la lyse du caillot plasmatique d'un animal ayant reçu préalablement une injection de complexe aprotinine-plasmine signifie que du complexe aprotinine-plasmine est encore présent dans le sang au
10 moment du prélèvement. Ceci montre que le complexe est susceptible de poursuivre son action pendant une durée prolongée, ce qui n'est pas observé avec les fibrinolytiques actuellement utilisés en clinique (streptokinase, urokinase ou plasmine).

15 L'Inventeur a pratiqué cet essai en prélevant le sang dans l'artère centrale de l'oreille avant l'administration du complexe aprotinine-plasmine, puis 1 mn après, 30 minutes après, 2 heures, 4 heures et 5 heures 30 après l'injection dans la veine marginale de l'oreille.

20 Les résultats observés après injection de 25 microkatal de lys-plasmine inhibée par 2mg d'aprotinine pure, sont consignés dans le Tableau ci-après.

Le signe "+" indique que le caillot a lysé.

Le signe "0" qu'il n'y a pas eu de lyse.

25 On constate que, chez 5 animaux sur 6, le complexe est encore présent à la 2ème heure et que chez 3 animaux sur 6, il est encore présent au cours de la 5ème heure.

T A B L E A U
L Y S E D U C A I L L O T L A V E

Lapins n°	85	87	89	90	25	26
Prélèvement 1 mn après I.V.	+	+				
30 mn après I.V.	+	+				
45 mn après I.V.			+	+	+	+
2 heures après I.V.	+	+	0	+		
3 h 30 mn après I.V.			0	+	+	Prélèvement impossible
5 h 30 mn après I.V.			Pas de prélèvement	+	+	+

Nota : Un essai de contrôle est effectué pour chaque animal, avec le sang prélevé avant injection du complexe. Dans tous les cas, aucune lyse n'est observée.

+ = lyse du caillot
0 = pas de lyse du caillot

5°) Etude de l'activité fibrinolytique du complexe aprotinine-plasmine in vivo

Cette étude a été effectuée sur le lapin.

18 animaux ont été utilisés.

- 5 On dégage une fémorale de lapin, on fait une ligature d'amont amovible, et, après avoir chassé le sang de la partie fémorale dégagée, on fait une ligature d'aval, également amovible.

- 10 A l'aide d'une petite aiguille de 4/10è, on injecte dans la partie ainsi isolée, du sang prélevé dans l'artère centrale de l'oreille du lapin (soit environ 0,05 à 0,10 ml).

L'aiguille étant maintenue en place, on injecte 0,01 ml de solution de thrombine concentrée.

- 15 Il se forme presque immédiatement un caillot à l'intérieur de la partie isolée. On déplace alors la ligature d'aval en direction de la ligature d'amont, de manière que la ligature d'aval se trouve en amont du trou de piqûre, puis on lève très légèrement la ligature d'amont
20 pour faire pénétrer un peu de sang dans le sac formé par les deux ligatures.

Le sang introduit se coagule sous l'effet de la thrombine précédemment introduite dans le sac.

- On laisse les deux ligatures en place pendant
25 1/4 d'heure au bout duquel on retire totalement la ligature d'amont.

La thrombine contenue dans le caillot diffuse alors et s'étend dans des zones non dénudées.

- Une heure après le début de l'expérience, on
30 lève la ligature d'aval.

Résultats

Animaux témoins :

- Des observations effectuées 24 heures et 48 heures plus tard, montrent que l'artère est complètement bouchée et que le caillot reste en place.
35

Animaux traités

12 lapins sont traités immédiatement après l'enlèvement de la ligature d'aval, par une injection massive de complexe comprenant 50 microkats de plasmine et
5 200 000 uIP d'aprotinine dans la veine marginale de l'oreille.

On observe chez 50 % des animaux la libération totale de l'artère dans les 24 heures qui suivent l'injection.

10 Cette étude montre que, dans les conditions expérimentales, le complexe aprotinine-plasmine conforme à l'invention est capable de lyser un caillot in vivo chez le lapin.

6°) Tests de toxicité

15 On a injecté à la souris une quantité de complexe comprenant 2 microkats de plasmine et 8 000 uIP d'aprotinine dans 0,5 ml de sérum physiologique, par voie intraveineuse. On a utilisé pour réaliser ces tests de toxicité, dix animaux : aucune anomalie n'a été constatée : les dix animaux étaient vivants au bout de 21
20 jours.

7°) Indications et posologie

Le nouveau complexe aprotinine-plasmine conforme à l'invention est particulièrement indiqué pour tous traitements fibrinolytiques et notamment pour le traitement des
25 embolies, des thromboses, des microcaillots des capillaires, des coagulations intravasculaires disséminées (CIVD) fréquentes en néphrologie, etc...

La stabilité du complexe conforme à l'invention
30 pourrait avantageusement être utilisée pour obtenir une fibrinolyse thérapeutique locale, notamment dans les thromboses artérielles, du fait que son activité se prolonge pendant plusieurs heures, au lieu de ne durer que quelques minutes comme c'est le cas pour les fibrinolytiques
35 actuellement connus.

Le complexe est avantageusement dosé de manière à administrer de 50 à 300 microkatals de plasmine complexée avec l'aprotinine par 24 heures.

5 Le complexe conforme à l'invention est avantageusement administré en association avec un véhicule pharmaceutique acceptable, tel que le soluté chloruré isotonique, par exemple, par voie parentérale, de préférence intraveineuse.

10 Il résulte de la description qui précède que, quels que soient les modes de mise en oeuvre et de réalisation adoptés, l'on obtient un médicament doué d'une activité fibrinolytique efficace et rapide, à des doses relativement réduites.

15 Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre et de réalisation qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse, au contraire, toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la
20 portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°- Médicament nouveau caractérisé en ce qu'il est constitué par un complexe aprotinine-plasmine.

5 2°- Médicament nouveau selon la Revendication 1, caractérisé en ce qu'il est constitué par un complexe aprotinine-lys plasmine humaine.

3°- Complexe selon la Revendication 1 ou la Revendication 2, caractérisé en ce que la plasmine est présente sous la forme de son précurseur, le plasminogène associé à un activateur.

4°- Complexe selon l'une quelconque des Revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'aprotinine et la plasmine sont présentes dans le complexe, dans un rapport aprotinine/plasmine de l'ordre de 2/1.

15 5°- Procédé de préparation du nouveau médicament selon l'une quelconque des Revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il consiste à mettre en contact de la plasmine ou son précurseur, le plasminogène associé à un activateur, avec de l'aprotinine, en quantités appropriées, dans un solvant convenable, le complexe aprotinine-plasmine formé étant purifié par passage sur une colonne de Sépharose-lysine, de manière à éliminer l'excès éventuel d'aprotinine et le cas échéant l'activateur, si celui-ci a été précédemment ajouté, le

20 complexe étant ensuite élué par l'acide ϵ -amino-caproïque à une concentration molaire d'au moins 0,05 M.

25 6°- Procédé selon la Revendication 5, caractérisé en ce que dans le cas où l'on met en oeuvre le précurseur de la plasmine, à savoir le plasminogène, celui-ci est de préférence du lys-plasminogène et notamment du lys-plasminogène humain.

30 7°- Procédé selon l'une quelconque des Revendications 5 ou 6, caractérisé en ce que l'activateur associé au plasminogène, est l'urokinase.

8°- Procédé selon la Revendication 5, caractérisé en ce que le mélange d'aprotinine et de plasmine comprend au moins 3 500 à 5 000 UIP d'aprotinine pour 1 microkatal de plasmine, et avantageusement 3 600 à 4 000 UIP d'aprotinine pour 1 microkatal de plasmine.

9°- Procédé selon l'une quelconque des Revendications 5 à 8, caractérisé en ce que la complexation de l'aprotinine et de la plasmine est réalisée par incubation d'un mélange d'aprotinine et de plasmine, ou de plasminogène associé à un activateur, à une température comprise entre l'ambiante et 40°C.

10°- Procédé selon la Revendication 9, caractérisé en ce que dans le cas où l'on utilise le plasminogène associé à un activateur, la durée de l'incubation est suffisante - de l'ordre d'une heure environ - pour provoquer la transformation du plasminogène en plasmine et la complexation de cette dernière avec l'aprotinine, ce temps pouvant être réduit à quelques minutes dans le cas où l'on met en oeuvre la plasmine.

11°- Procédé selon l'une quelconque des Revendications 5 à 10, caractérisé en ce que le pH du mélange est de l'ordre de $7,4 \pm 0,4$.

12°- Procédé selon l'une quelconque des Revendications 5 à 11, caractérisé en ce que le complexe formé est lyophilisé.

1 / 1

