

ROYAUME DE BELGIQUE



MINISTRE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

BREVET D'INVENTION

NUMERO DE PUBLICATION : 1001425A4

NUMERO DE DEPOT : 8700510

Classif. Internat.: A61K

Date de délivrance : 31 Octobre 1989

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la Convention de Paris du 20 Mars 1883 pour la Protection de la propriété industrielle;

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d' invention, notamment l' article 22;

Vu l' arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d' invention, notamment l' article 28;

Vu le procès verbal dressé le 11 Mai 1987 à 15h50
à l' Office de la Propriété Industrielle

ARRETE:

ARTICLE 1.- Il est délivré à : THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED
Euston Road 183-193, LONDON NW1 2BP(ROYAUME-UNI)

représenté(e)(s) par : PLUCKER Guy, OFFICE KIRKPATRICK, Square de Meeûs, 4
- 1040 BRUXELLES.

un brevet d' invention d' une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : UTILISATION DE L'ACTIVATEUR TISSULAIRE DU PLASMINOGENE, SON ASSOCIATION AVEC UNE SUPEROXYDE-DISMUTASE ET FORMULATION PHARMACEUTIQUE CONTENANT CETTE ASSOCIATION.

Priorité(s) 12.05.86 US USA 862046 12.05.86 US USA 862057

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l' invention, sans garantie du mérite de l' invention ou de l' exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeur(s).

Bruxelles, le 31 Octobre 1989
PAR DELEGATION SPECIALE :

D. VANDERGHEYNST
Conseiller-adjoint à l'Office
de la Propriété Industrielle

Utilisation de l'activateur tissulaire du plasminogène, son association avec une superoxyde-dismutase et formulation pharmaceutique contenant cette association.

La présente invention concerne l'activateur tissulaire du plasminogène, son association avec une superoxyde-dismutase, des formulations pharmaceutiques les contenant et leur emploi en médecine humaine et vétérinaire.

- 5 Il existe un équilibre dynamique entre le système enzymatique capable de former des caillots sanguins (le système coagulateur) et le système enzymatique capable de dissoudre les caillots sanguins (le système fibrinolytique) qui maintient à l'état dégagé un lit vasculaire intact.
- 10 Pour limiter la perte de sang par une blessure, des caillots sanguins sont formés dans le vaisseau lésé. Après la réparation naturelle de la blessure, les caillots sanguins superflus sont dissous par l'action du système fibrinolytique. Des caillots sanguins peuvent occasionnellement se former
- 15 en l'absence de blessure traumatique et peuvent se loger dans des vaisseaux sanguins importants en faisant ainsi partiellement ou même totalement obstacle à l'écoulement du sang. Si cela se produit dans le coeur, le poumon ou le cerveau, il peut s'ensuivre un infarctus du myocarde, une
- 20 embolie pulmonaire ou un ictus cérébral. Ces affections constituent ensemble la principale cause de morbidité et de mortalité dans les nations industrialisées.

- Les caillots sanguins sont constitués d'un réseau fibreux qui est susceptible d'être dissous par une enzyme
- 25 protéolytique, la plasmine. Cette enzyme est dérivée d'une pro-enzyme inactive, le plasminogène, un composant du plasma sanguin, sous l'action d'un activateur de plasminogène. Il existe chez les mammifères deux activateurs de plasminogène immunologiquement distincts. L'activateur intrinsèque du
- 30 plasminogène, également connu en tant qu'urokinase, est une enzyme produite par le rein qui peut être isolée de l'urine. On peut également le préparer à partir d'un certain nombre de cultures tissulaires qui en sont des sources. L'activateur extrinsèque du plasminogène, également connu en tant qu'acti-
- 35 vateur vasculaire du plasminogène et en tant qu'activateur tissulaire du plasminogène (AP-t), peut être isolé de nom-

breux homogénats tissulaires (notamment d'utérus humain), de la paroi des cellules vasculaires et de certaines cultures tissulaires. En plus de ces deux types d'activateurs du plasminogène, il existe également un produit bactérien, la streptokinase, préparé à partir de streptocoques bêta-hémolytiques. Un inconvénient majeur affectant à la fois l'urokinase et la streptokinase est qu'elles sont actives dans toute la circulation et non juste à l'emplacement d'un caillot sanguin. Elles peuvent, par exemple, détruire d'autres protéines du sang, telles que le fibrinogène, la prothrombine, le facteur V et le facteur VIII, en réduisant ainsi le pouvoir de coagulation du sang et en augmentant le risque d'hémorragie. Par contre, l'activité biologique de AP-t dépend de la présence de fibrine à laquelle il se lie et où il est activé. L'activité maximale ne se développe ainsi qu'au seul emplacement d'un caillot sanguin, c'est-à-dire en présence du réseau fibrineux à dissoudre, et le risque d'hémorragie s'en trouve écarté dans une large mesure.

L'interruption du courant sanguin dans un vaisseau mène généralement à la survenue d'une ischémie. Dans cette situation, le tissu est privé d'oxygène et se trouve menacé, un état dans lequel le tissu est altéré mais encore potentiellement viable. Cependant, si cette situation se prolonge pendant une période de, par exemple, trois heures ou plus, le tissu se nécrose et, une fois dans cet état, ne peut être récupéré. Il est donc important qu'une réirrigation, c'est-à-dire le rétablissement du courant sanguin, ait lieu aussi tôt que possible pour sauver le tissu avant qu'il ne soit définitivement endommagé. Ironiquement, même si elle est réalisée avant que le tissu ne devienne nécrotique, la réirrigation elle-même engendre un ensemble complexe de phénomènes, y compris la formation présumée du radical superoxyde, qui exercent un effet délétère sur le tissu hypoxique. Par conséquent, la réirrigation ne peut conduire qu'à une récupération partielle du tissu menacé, le reste étant définitivement endommagé par la survenue d'un ou plusieurs de ces phénomènes.

- On a maintenant découvert que AP-t inhibe l'endommagement d'un tissu menacé pendant la réirrigation en protégeant ce tissu à l'encontre d'un ou plusieurs des phénomènes susmentionnés. Le mécanisme d'action par lequel AP-t apporte cette protection n'a pas été explicité mais il n'est pas lié à son activité d'agent thrombolytique. Cette propriété nouvellement découverte donne ainsi la possibilité d'utiliser AP-t, ou une formulation pharmaceutique le contenant, comme inhibiteur d'endommagement de tissu menacé dans les circonstances globalement exposées ici. En conséquence, la présente invention propose :
- (a) un procédé pour inhiber l'endommagement d'un tissu menacé pendant une réirrigation chez un mammifère, qui consiste à administrer au mammifère une quantité efficace de AP-t ;
 - (b) l'utilisation de AP-t pour inhiber l'endommagement d'un tissu menacé pendant une réirrigation chez un mammifère ;
 - (c) l'utilisation de AP-t pour la fabrication d'un médicament destiné à l'inhibition de l'endommagement d'un tissu menacé pendant une réirrigation chez un mammifère ; et
 - (d) une formulation pharmaceutique à utiliser pour inhiber l'endommagement d'un tissu menacé pendant une réirrigation chez un mammifère, qui comprend AP-t et un support pharmaceutiquement acceptable.

Bien que la présente invention puisse être mise en oeuvre pour protéger un quelconque tissu menacé, elle est particulièrement utile pour inhiber l'endommagement d'un tissu myocardique menacé.

Le AP-t à utiliser dans la présente invention peut être n'importe quelle protéine biologiquement active correspondant sensiblement au AP-t des mammifères, et en particulier des êtres humains, et il englobe les formes avec et sans glycosylation. Il peut s'agir de AP-t à une ou deux chaînes, ou d'un mélange de tels AP-t, comme décrit dans le document EP-A-112 122, et, dans le cas de AP-t humain totalement glycosylé, son poids moléculaire apparent sur gel de polyacrylamide est d'environ 70 000 et son point

isoélectrique est compris entre 7,5 et 8,0. De préférence, l'activité spécifique du AP-t est d'environ 500 000 UI/mg (Unités Internationales/mg, l'Unité Internationale étant une unité d'activité définie par le National Institute for Biological Standards and Control, Holly Hill, Hampstead, Londres, NW3 6RB, Royaume-Uni, dans le cadre de l'Organisation Mondiale de la Santé).

La séquence d'acides-amino de AP-t correspond de préférence sensiblement à celle qui est exposée sur la figure 1 des dessins annexés. Il s'agit donc d'une séquence identique à celle de la figure 1 ou comportant une ou plusieurs délétions, substitutions, insertions, inversions ou additions d'acides-amino, d'origine allélomorphe ou autre, la séquence résultante présentant au moins 80 %, et de préférence 90 %, d'homologie avec la séquence de la figure 1 et conservant essentiellement les mêmes propriétés biologiques et immunologiques que cette protéine. En particulier, la séquence est identique à celle de la figure 1 ou bien est la même à la différence que l'acide-amino de la 245ème position à partir de la sérine N-terminale est la valine au lieu de la méthionine, l'une ou l'autre séquence contenant éventuellement une préséquence polypeptidique N-terminale additionnelle consistant en Gly-Ala-Arg.

La séquence d'acides-amino représentée sur la figure 1 contient trente-cinq résidus de cystéine et a donc la capacité de former dix-sept ponts disulfure. Sur la base d'une analogie faite avec d'autres protéines dont la structure a été déterminée plus en détail, la figure 2 montre la structure proposée pour la séquence (résultant de la formation de ponts disulfure) comprise entre l'acide-amino de la 90ème position et la proline C-terminale. On est moins sûr de la structure de la région N-terminale, bien que quelques propositions aient été avancées (Progress in Fibrinolysis, 1983, 6, 269-273 ; et Proc. Natl. Acad. Sci., 1984, 81, 5355-5359). Les caractéristiques les plus importantes de la structure de AP-t sont les deux régions en anneau (comprises

entre les 92ème et 173ème amino-acides et entre les 180ème et 261ème amino-acides), qui sont responsables de la liaison de la protéine à la fibrine, et la région des sérine-protéases qui constitue la majeure partie de la chaîne B et qui est responsable de l'activation du plasminogène. Les amino-acides particulièrement importants des sérine-protéases sont ceux de la triade catalytique His/Asp/Ser. Dans AP-t, ceux-ci apparaissent aux 322ème, 371ème et 463ème positions. Le pont disulfure reliant les résidus de cystéine des 264ème et 395ème positions est également important en ce sens qu'il maintient ensemble les chaînes A et B dans la forme bicaténaire de AP-t.

Sur les figures 1 et 2, les résidus d'acides aminés sont désignés par les codes conventionnels à une et trois lettres suivants :

Asp D	Acide aspartique	Cys C	Cystéine	His H	Histidine
Thr T	Thréonine	Val V	Valine	Arg R	Arginine
Ser S	Sérine	Ile I	Isoleucine	Lys K	Lysine
Glu E	Acide glutamique	Leu L	Leucine	Trp K	Tryptophanne
Pro P	Proline	Tyr Y	Tyrosine	Gln Q	Glutamine
Gly G	Glycine	Phe F	Phénylalanine	Met M	Méthionine
Ala A	Alanine	Asn N	Asparagine		

Sur la figure 2, l'astérisque désigne le site de clivage de AP-t monocaténaire en AP-t bicaténaire dans lequel la chaîne A contient les deux régions en anneau et la chaîne B contient la région des sérine-protéases.

Le AP-t peut être obtenu par l'une quelconque des techniques décrites ou connues dans l'art antérieur. Par exemple, on peut l'obtenir à partir d'une lignée cellulaire normale ou néoplasique du type décrit dans Biochemica et Biophysica Acta, 1979, 580, 140-153 ; et les documents EP-A-41 766 et EP-A-113 319. On préfère cependant que AP-t soit tiré d'une lignée cellulaire cultivée transformée et transfectée, dérivée en utilisant une technique d'ADN recombinant comme décrit par exemple dans les documents EP-A-93 619, EP-A-117 059, EP-A-117 060, EP-A-173 552, EP-A-174 835, EP-A-178 105, WO 86/01538, WO 86/05514 et WO 86/05807.

On préfère en particulier l'utilisation de cellules d'ovaire de hamster chinois (OHC) pour la production de AP-t, et que ces cellules soient dérivées de la manière décrite dans Molecular and Cellular Biology, 1985, 5(7), 1750-1759. Selon

5 cette méthode, le gène cloné est co-transfecté avec le gène codant la dihydrofolate-réductase (dhfr) dans des cellules dhfr⁻ de OHC. Les transformants exprimant dhfr sont sélectionnés sur des milieux manquant de nucléosides et sont exposés à des concentrations croissantes de méthotrexate.

10 Les gènes de dhfr et de AP-t sont ainsi amplifiés conjointement en conduisant à une lignée cellulaire stable capable d'exprimer des taux élevés de AP-t.

De préférence, on purifie le AP-t en utilisant n'importe laquelle des techniques décrites ou connues dans

15 l'art antérieur, par exemple les techniques décrites dans Biochemica et Biophysica Acta, 1979, 580, 140-153 ; J. Biol. Chem., 1979, 254(6), 1998-2003 ; ibid., 1981, 256(13), 7035-7041 ; Eur. J. Biochem., 1983, 132, 681-686 ; et les documents EP-A-41 766, EP-A-113 319 et GB-A-2 122 219.

20 Le AP-t peut être utilisé à la manière de la présente invention soit seul, soit en association avec un autre agent thérapeutique qui inhibe également l'endommagement d'un tissu menacé pendant une réirrigation. Un exemple particulièrement utile d'une telle association est celle faite avec

25 la superoxyde-dismutase (SOD), une enzyme dont on sait qu'elle entraîne et détruit les radicaux superoxyde qui sont l'agent d'un des phénomènes capables de provoquer l'endommagement du tissu. En fait, on a également constaté que le degré d'inhibition offert par l'association de AP-t et SOD est

30 fortement potentialisé comparativement à ceux que procurent AP-t et SOD par eux-mêmes. En conséquence, la présente invention propose également une association de AP-t et de SOD.

L'association de AP-t et SOD fournit un moyen particulièrement commode pour réaliser à la fois l'élimination

35 des caillots sanguins et l'inhibition de l'endommagement d'un tissu menacé pendant une réirrigation subséquente.

Ainsi, de l'administration de AP-t et SOD résulte tout d'abord l'élimination du caillot sanguin sous l'action thrombolytique connue de AP-t, puis l'inhibition de l'endommagement du tissu sous les actions conjuguées de AP-t et de SOD.

5 La SOD à utiliser en association avec AP-t peut être n'importe quelle protéine biologiquement active correspondant sensiblement à l'une ou plusieurs quelconques d'un groupe d'enzymes globalement désignées par ce nom. Elle est de préférence d'origine mammifère et en particulier bovine
10 ou humaine, et se trouve généralement combinée à un cation métallique dont on se sert normalement pour la classer. Des exemples de cations métalliques comprennent ceux de fer, manganèse et cuivre et, de préférence, des associations de cuivre avec d'autres métaux tels que le zinc, le cadmium,
15 le cobalt ou le mercure, parmi lesquelles on préfère l'association cuivre/zinc. Les formes combinées au manganèse et au cuivre/zinc de SOD se rencontrent naturellement chez les êtres humains. Les formes combinées au fer et au manganèse de SOD d'origine bactérienne ont toute deux un poids moléculaire d'environ 40 000 et sont des dimères. D'autre part,
20 la forme combinée au manganèse de SOD d'origine eucaryotique est un tétramère dont le poids moléculaire est d'environ 80 000. La forme combinée au cuivre/zinc de SOD d'origine eucaryotique est un dimère qui contient un cation cuivre et
25 un cation zinc par sous-unité et dont le poids moléculaire est d'environ 32 000. Le cation cuivre est lié par coordination à quatre résidus d'histidine par sous-unité et le cation zinc est lié par coordination entre un résidu d'histidine et un résidu d'acide aspartique. Il existe également
30 une forme combinée au cuivre/zinc de SOD d'origine eucaryotique qui se compose de quatre sous-unités et dont le poids moléculaire est d'environ 130 000. Les poids moléculaires des diverses formes de SOD ont été estimés par équilibre de sédimentation, tamisage moléculaire ou en utilisant des gels
35 de polyacrylamide. Les points isoélectriques des diverses formes de SOD s'échelonnent de 4 à 6,5, selon le degré de

sulfatation et/ou de désamidation. De préférence, l'activité spécifique de la forme combinée au cuivre/zinc de SOD d'origine bovine ou humaine est d'au moins 3000 U/mg (l'unité d'activité étant comme définie dans J. Biol. Chem., 1969, 244, 6049-6055).

La séquence d'acides-amino de la forme combinée au cuivre/zinc de SOD d'origine bovine ou humaine correspond de préférence sensiblement à celle exposée dans J. Biol. Chem., 1974, 249(22), 7326-7338, dans le cas de l'origine bovine, et dans Biochemistry, 1980, 19, 2310-2316 et FEBS Letters, 1980, 120, 53-55, dans le cas de l'origine humaine. Cette séquence est donc identique à l'une de celles exposées dans ces articles ou comporte une ou plusieurs délétions, substitutions, insertions, inversions ou additions d'acides-amino, d'origine allélomorphe ou autre, la séquence résultante étant suffisamment homologue à la séquence publiée choisie pour conserver essentiellement les mêmes propriétés biologiques et immunologiques.

La séquence d'acides-amino de la forme combinée au cuivre/zinc de SOD d'origine bovine contient trois résidus de cystéine par sous-unité (J. Biol. Chem., 1974, 249(22), 7326-7338). Le pont disulfure intracaténaire se trouve entre les résidus Cys 55 et Cys 144, tandis que le pont disulfure intercaténaire se trouve entre les résidus Cys 6. La séquence d'acides-amino de la forme combinée au cuivre/zinc de SOD d'origine humaine contient quatre résidus de cystéine par sous-unité (Biochemistry, 1980, 19, 2310-2316, et FEBS Letters, 1980, 120, 53-55). Le pont disulfure intracaténaire se trouve entre les résidus Cys 57 et Cys 146, tandis que le pont disulfure intercaténaire se trouve entre les résidus Cys 6. Le résidu Cys 111 reste libre.

La SOD peut être obtenue par n'importe quelle technique décrite ou connue dans l'art antérieur. Par exemple, on peut la tirer des érythrocytes ou du foie par un procédé d'extraction du type décrit dans les documents GB-A-1 407 807 et GB-A-1 529 890. En variante, la SOD peut être tirée d'une

lignée cellulaire cultivée transformée ou transfectée, dérivée en utilisant une technique d'ADN recombinant comme décrit, par exemple, dans la demande de brevet australien N° 27461/84 et les documents WO 85/01503, EP-A-138 111, 5 EP-A-164 566, EP-A-173 280 et EP-A-180 964.

La SOD est de préférence purifiée par une quelconque technique appropriée décrite ou connue dans l'art antérieur, par exemple la technique décrite dans le document EP-A-112 299.

10 Pour utiliser AP-t, ou une association de AP-t et SOD, à la manière de la présente invention, il est préférable d'employer le ou les ingrédients actifs sous forme d'une formulation pharmaceutique. Dans le cas de l'association, les ingrédients actifs peuvent se trouver dans des 15 formulations séparées qui sont administrées simultanément ou successivement. Si on les administre successivement, il est préférable d'administrer d'abord la formulation contenant AP-t et ensuite la formulation contenant SOD. Dans l'un ou 20 l'autre cas, le délai d'administration de la seconde des deux formulations ne doit pas être tel que l'on perde le bénéfice de l'effet potentialisé d'inhibition de l'endommagement des tissus qui résulte de l'association in vivo des ingrédients actifs. Toutefois, plutôt que d'employer des formulations séparées, il est bien plus commode de présenter 25 les deux ingrédients actifs ensemble dans une seule formulation mixte. En conséquence, la présente invention propose également une formulation pharmaceutique qui comprend AP-t et SOD et un support pharmaceutiquement acceptable.

En général, le AP-t ou l'association de AP-t et 30 SOD seront administrés par voie intravasculaire, que ce soit par perfusion ou par injection d'un embol, et une formulation à usage parentéral est donc nécessaire. Il est préférable de présenter une formulation lyophilisée au médecin ou au vétérinaire en raison des importants avantages qu'offre une telle 35 formulation sur le plan du transport et de la conservation. Le médecin ou le vétérinaire peut ensuite reconstituer la

formulation lyophilisée dans une quantité appropriée de solvant, comme il le faut et au moment voulu.

Des formulations pharmaceutiques contenant AP-t, lyophilisées et à usage parentéral, sont connues dans l'art antérieur. Des exemples en sont fournis par les documents
5 EP-A-41 766, EP-A-93 619, EP-A-112 122, EP-A-113 319, EP-A-123 304, EP-A-143 081, EP-A-156 169, WO 86/01104, le brevet japonais publié N° 57-120523 (demande N° 56-6936) et le brevet japonais publié N° 58-65218 (demande N° 56-163145).
10 D'autres exemples préférés sont fournis par les documents GB-A-2 176 702 et GB-A-2 176 703. Toutes ces formulations conviennent également pour SOD et pour l'association de AP-t et SOD.

Les perfusions intravasculaires sont normalement effectuées en utilisant la solution à usage parentéral contenue dans un sachet ou un flacon de perfusion ou encore dans une seringue de perfusion actionnée électriquement. La solution peut être délivrée au malade à partir du sachet ou du flacon sous l'effet d'un écoulement par gravité ou en
20 utilisant une pompe de perfusion. L'utilisation de systèmes de perfusion à écoulement par gravité ne permet pas de maîtriser suffisamment la vitesse d'administration de la solution à usage parentéral et on préfère donc l'utilisation d'une pompe de perfusion, notamment avec les solutions dont
25 la concentration en ingrédients actifs est relativement élevée. On préfère cependant encore plus l'utilisation d'une seringue de perfusion actionnée électriquement qui permet de maîtriser mieux encore la vitesse d'administration.

La quantité de AP-t, et d'une association de AP-t et SOD, qui est efficace pour inhiber l'endommagement d'un tissu menacé pendant une réirrigation est évidemment fonction d'un certain nombre de facteurs comprenant, par exemple l'âge et le poids du mammifère, l'affection exacte nécessitant le traitement et sa gravité, la voie d'administration,
30 et cette quantité sera en fin de compte laissée à l'appréciation du médecin ou vétérinaire traitant. Toutefois, dans

le cas de AP-t, une dose efficace est généralement comprise dans l'intervalle de 0,2 à 4 mg/kg (c'est-à-dire de 100 000 à 2 000 000 UI/kg en admettant une valeur de 500 000 UI/mg pour l'activité spécifique de AP-t), de préférence de 0,3 à 2 mg/kg (c'est-à-dire 150 000 à 1 000 000 UI/kg), de poids corporel du malade et par heure. Ainsi, pour un être humain adulte pesant 70 kg, une quantité efficace par heure est de préférence comprise entre 20 et 140 mg (c'est-à-dire entre 10 000 000 et 70 000 000 UI), et en particulier d'environ 70 mg (c'est-à-dire 35 000 000 UI). Dans le cas où AP-t est associé à SOD, une dose efficace de SOD est alors généralement comprise dans l'intervalle de 1000 à 50 000 U/kg, de préférence de 7000 à 20 000 U/kg, de poids corporel du malade et par heure. Ainsi, pour un être humain adulte pesant 70 kg, une quantité efficace de SOD, par heure, est de préférence comprise entre 500 000 et 1 500 000 U.

Les exemples non limitatifs suivants illustrent la présente invention.

Exemple 1 : Préparation d'une Formulation de AP-t à Usage Parentéral

On prépare une formulation de AP-t à usage parentéral en procédant sensiblement comme décrit dans le document GB-A-2 176 703 ; l'activité spécifique du AP-t utilisé est d'environ 300 000 UI/mg.

Exemple 2 : Préparation d'une Formulation de SOD à Usage Parentéral

On dissout dans du sérum physiologique sensiblement neutre de la SOD bovine, forme combinée au cuivre/zinc, fournie sous forme d'une poudre par Sigma Chemical Co., St Louis, Missouri, U.S.A., 63178.

Exemple 3 : Préparation d'une Formulation de AP-t et SOD à Usage Parentéral

On mélange les formulations des Exemples 1 et 2 et on dilue encore le mélange obtenu pour atteindre le dosage requis.

Exemple 4 : Protection de tissu menacé en utilisant AP-t
et en utilisant AP-t et SOD

(a) Méthodologie

On anesthésie des chiens de race bigle mâles
5 (10-12 kg) avec du pentobarbital sodique, les intube et
les ventile à l'air ambiant au moyen d'un respirateur de
Harvard. On implante des cathéters pour perfusion et mesures
de pression artérielle dans la veine jugulaire gauche et
l'artère carotide gauche. On pratique une thoracotomie au
10 niveau du quatrième espace intercostal, on suspend le coeur
dans un arceau péricardique et on isole l'artère interven-
triculaire antérieure (AIA) juste au-dessous de la première
branche diagonale principale. On place une sonde de débit
électromagnétique sur l'AIA. On provoque une occlusion de
15 l'AIA pendant 90 minutes en plaçant une anse de fil de soie
1/0 en aval de la sonde de débit. On commence le traitement
par voie intraveineuse quinze minutes avant la levée de
l'anse d'occlusion et le poursuit pendant 45 minutes après
la levée. On referme la thoracotomie et on laisse les ani-
20 maux se remettre des actes chirurgicaux. On anesthésie de
nouveau les animaux 24 heures après l'occlusion et on redé-
termine le débit dans l'AIA. On retire ensuite le coeur
pour une quantification post-mortem de la taille de l'in-
farctus.

25 On soumet quatre groupes de chiens à l'évaluation.
Le Groupe I se compose de témoins recevant une solution sa-
line. Les animaux du Groupe II reçoivent 2,5 mg/kg (750 000
UI/kg) de AP-t, ceux du Groupe III reçoivent 16 500 U/kg de
SOD bovine et ceux du Groupe IV reçoivent 2,5 mg/kg (750 000
30 UI/kg) de AP-t ainsi que 16 500 U/kg de SOD bovine. Les for-
mulations utilisées sont celles décrites dans les Exemples
1 à 3.

On détermine quantitativement la taille des infarc-
tus du myocarde par une technique de double perfusion
35 extra vivo. On introduit des canules dans l'AIA immédiate-
ment en aval du site d'occlusion et dans l'aorte au-dessus

des orifices coronaires. On perfuse dans le lit coronaire de AIA du chlorhydrate de triphényl-tétrazolium (CTT) à 1,5 % dans du phosphate de potassium tampon 0,02M, pH 7,4. On perfuse du bleu Evans à 0,5 % en mode rétrograde dans l'aorte. On met les deux régions sous perfusion avec leurs colorants respectifs à une pression constante de 100 mm de mercure pendant cinq minutes. On découpe le coeur en tranches de 8 mm perpendiculaires à l'axe pointe-base. On identifie par l'absence de bleu Evans la zone du ventricule gauche qui est soumise au risque d'infarctus en raison de sa dépendance anatomique à l'égard de l'AIA en ce qui concerne le courant sanguin. A l'intérieur de la zone à risque, la région de myocarde infarcté se démarque par l'absence de coloration du tissu une fois qu'il a été soumis à la perfusion de CTT, et ce en raison d'une perte de déshydrogénases.

On dessine soigneusement les coupes ventriculaires transversales sur des calques acryliques transparents pour disposer d'un enregistrement permanent de la morphologie de l'infarctus et permettre la confirmation planimétrique de la taille de l'infarctus. On débarrasse ensuite les coupes ventriculaires du muscle ventriculaire droit, des valvules et du tissu adipeux. On sépare par une dissection soignée la zone à risque totale du ventricule gauche et l'infarctus, et on les pèse. La taille de l'infarctus est exprimée en pourcentage par rapport à la zone anatomique à risque. On procède à une comparaison statistique de chaque groupe traité par un médicament avec le groupe témoin en effectuant une analyse univoque de variance par la méthode de Bonferroni pour comparaison multiple (Circulation Research, 1980, 47, 1-9). On prend une valeur p inférieure à 0,05 comme critère de significativité.

(b) RésultatsTABLEAU

5	GROUPE		NOMBRE DE CHIENS	ZONE A RISQUE INFARCIE	% DE VENTRI- CULE SOUMIS AU RISQUE*
	I.	Solution saline	5	$36,0 \pm 8,9$	$37,3 \pm 7,6$
	II.	AP-t	6	$14,3 \pm 11,7$	$35,7 \pm 5,4$
	III.	SOD	4	$13,0 \pm 4,6$	$30,6 \pm 2,6$
	IV.	AP-t + SOD	3	$2,3 \pm 1,3$	$37,2 \pm 9,1$

10 * Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type.

Selon l'analyse de variance, la proportion de ventricule gauche rendue ischémique par occlusion mécanique de l'AIA ne diffère pas significativement entre aucun des groupes traités et le groupe témoin.

15 (c) Conclusions

L'utilisation de AP-t inhibe significativement la taille de l'infarctus du myocarde, ce qui démontre son aptitude à protéger le tissu menacé pendant la réirrigation. De plus, par l'utilisation conjointe de AP-t et SOD, on par-
 20 vient à cet égard à produire un effet inhibiteur synergique, l'association procurant un taux d'inhibition supérieur à celui fourni par chacun de AP-t et SOD indépendamment.

REVENDEICATIONS

1. Utilisation d'un activateur tissulaire du plas-
minogène pour la fabrication d'un médicament destiné à inhi-
ber l'endommagement d'un tissu menacé pendant une réirriga-
5 tion chez un mammifère.

2. Utilisation d'un activateur tissulaire du plas-
minogène et d'une superoxyde-dismutase pour la fabrication
d'un médicament destiné à inhiber l'endommagement d'un tissu
menacé pendant une réirrigation chez un mammifère.

10 3. Utilisation d'un activateur tissulaire du plas-
minogène et d'une superoxyde-dismutase pour la fabrication
d'un médicament destiné à éliminer un caillot sanguin et à
inhiber l'endommagement d'un tissu menacé pendant une réirri-
gation chez un mammifère.

15 4. Utilisation selon l'une quelconque des revendi-
cations précédentes, le tissu étant un tissu myocardique.

5. Utilisation selon l'une quelconque des revendi-
cations précédentes, l'activateur tissulaire du plasminogène
étant sous forme monocaténaire.

20 6. Utilisation selon l'une quelconque des revendi-
cations 1 à 4, l'activateur tissulaire du plasminogène étant
sous forme bicaténaire.

7. Utilisation selon la revendication 5 ou 6,
l'activateur tissulaire du plasminogène ayant la séquence
25 d'acides-amino suivante :

Ser Tyr Gln Val Ile Cys Arg Asp Glu Lys Thr Gln Met Ile Tyr Gln Gln His Gln Ser
1
Trp Leu Arg Pro Val Leu Arg Ser Asn Arg Val Glu Tyr Cys Trp Cys Asn Ser Gly
Arg Ala Gln Cys His Ser Val Pro Val Lys Ser Cys Ser Glu Pro Arg Cys Phe Asn
50
Gly Gly Thr Cys Gln Gln Ala Leu Tyr Phe Ser Asp Phe Val Cys Gln Cys Pro Glu
30 Gly Phe Ala Gly Lys Cys Cys Glu Ile Asp Thr Arg Ala Thr Cys Tyr Glu Asp Gln
Gly Ile Ser Tyr Arg Gly Thr Trp Ser Thr Ala Glu Ser Gly Ala Glu Cys Thr Asn Trp
100
Asn Ser Ser Ala Leu Ala Gln Lys Pro Tyr Ser Gly Arg Arg Pro Asp Ala Ile Arg
Leu Gly Leu Gly Asn His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Asp Ser Lys Pro Trp
150
Cys Tyr Val Phe Lys Ala Gly Lys Tyr Ser Ser Glu Phe Cys Ser Thr Pro Ala Cys

Ser Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Gly Ser Ala Tyr Arg Gly Thr His
 Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys
 200
 Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr
 Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Met Leu Lys Asn Arg Arg
 250
 5 Leu Thr Trp Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr
 Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala Ser His Pro Trp
 Gln Ala Ala Ile Phe Ala Lys His Arg Arg Ser Pro Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly
 300
 Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe
 Pro Pro His His Leu Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu
 10 Glu Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp Asp Thr
 350
 Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser Ser Arg Cys Ala Gln
 Glu Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys Leu Pro Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp
 400
 Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser Gly Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr
 Ser Glu Arg Leu Lys Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser
 15 Gln His Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr Arg
 450
 Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
 Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu
 500
 Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp
 Trp Ile Arg Asp Asn Met Arg Pro
 527

- 20 ou ayant une séquence d'acides-amino identique à la différence que l'acide-amino de la 245ème position à partir de la sérine N-terminale est la valine au lieu de la méthionine, chacune de ces séquences comportant éventuellement une pré-séquence polypeptidique N-terminale additionnelle composée
 25 de Gly-Ala-Arg.

8. Utilisation selon la revendication 2 ou 3, la superoxyde-dismutase étant de la forme combinée au cuivre/zinc d'origine bovine ou humaine.

9. Association d'activateur tissulaire du plasminogène et de superoxyde-dismutase.

10. Association d'activateur tissulaire du plasminogène et de superoxyde-dismutase, destinée à être utilisée
5 en médecine humaine ou vétérinaire.

11. Association d'activateur tissulaire du plasminogène et de superoxyde-dismutase, destinée à être utilisée pour inhiber l'endommagement d'un tissu menacé pendant une réirrigation chez un mammifère.

10 12. Association d'activateur tissulaire du plasminogène et de superoxyde-dismutase, destinée à être utilisée pour éliminer un caillot sanguin et pour inhiber l'endommagement d'un tissu menacé pendant une réirrigation chez un mammifère.

15 13. Association selon l'une quelconque des revendications 9 à 12, l'activateur tissulaire du plasminogène étant sous forme monocaténaire.

14. Association selon l'une quelconque des revendications 9 à 12, l'activateur tissulaire du plasminogène
20 étant sous forme bicaténaire.

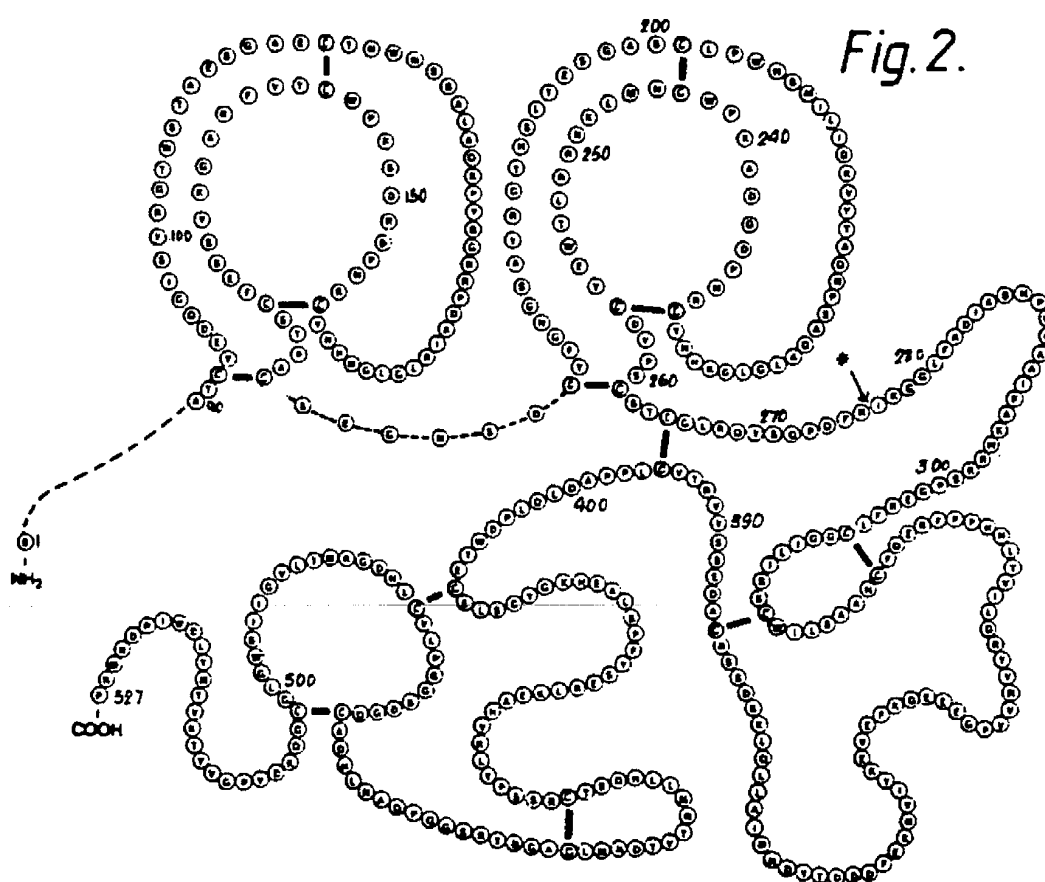
15. Association selon la revendication 13 ou 14, l'activateur tissulaire du plasminogène ayant la séquence d'acides aminés exposée dans la revendication 7 ou ayant une séquence d'acides aminés identique à la différence que l'acide
25 amine de la 245ème position à partir de la sérine N-terminale est la valine au lieu de la méthionine, chacune de ces séquences comportant éventuellement une préséquence polypeptidique N-terminale additionnelle composée de Gly-Ala-Arg.

16. Association selon l'une quelconque des revendications 9 à 12, la superoxyde-dismutase étant de la forme combinée au cuivre/zinc d'origine bovine ou humaine.
30

17. Formulation pharmaceutique comprenant une association selon l'une quelconque des revendications 9 à 16 et un support pharmaceutiquement acceptable.

Fig. 1.

Ser Tyr Gln Val Ile Cys Arg Asp Glu Lys Thr Gln Met Ile Tyr Gln Gln His Gln Ser
 1
 Trp Leu Arg Pro Val Leu Arg Ser Asn Arg Val Glu Tyr Cys Trp Cys Asn Ser Gly
 Arg Ala Gln Cys His Ser Val Pro Val Lys Ser Cys Ser Glu Pro Arg Cys Phe Asn
 50
 Gly Gly Thr Cys Gln Gln Ala Leu Tyr Phe Ser Asp Phe Val Cys Gln Cys Pro Glu
 Gly Phe Ala Gly Lys Cys Cys Glu Ile Asp Thr Arg Ala Thr Cys Tyr Glu Asp Gln
 Gly Ile Ser Tyr Arg Gly Thr Trp Ser Thr Ala Glu Ser Gly Ala Glu Cys Thr Asn Trp
 100
 Asn Ser Ser Ala Leu Ala Gln Lys Pro Tyr Ser Gly Arg Arg Pro Asp Ala Ile Arg
 Leu Gly Leu Gly Asn His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Asp Ser Lys Pro Trp
 150
 Cys Tyr Val Phe Lys Ala Gly Lys Tyr Ser Ser Glu Phe Cys Ser Thr Pro Ala Cys
 Ser Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Gly Ser Ala Tyr Arg Gly Thr His
 Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys
 200
 Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr
 Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Met Leu Lys Asn Arg Arg
 250
 Leu Thr Trp Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr
 Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala Ser His Pro Trp
 Gln Ala Ala Ile Phe Ala Lys His Arg Arg Ser Pro Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly
 300
 Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe
 Pro Pro His His Leu Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu
 Glu Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp Asp Thr
 350
 Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser Ser Arg Cys Ala Gln
 Glu Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys Leu Pro Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp
 400
 Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser Gly Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr
 Ser Glu Arg Leu Lys Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser
 Gln His Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr Arg
 450
 Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
 Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu
 500
 Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp
 Trp Ile Arg Asp Asn Met Arg Pro





Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE

établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numero de la demande
nationale

BE 8700510
BO 316

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
X,D	EP-A-0 123 304 (ASAI KASEI KOGYO K.K.) * Revendiction 1; page 5, dernier paragraphe; page 10, paragraphe 1 * ---	1,4,5	A 61 K 37/54 // (A 61 K 37/54 A 61 K 37:50)
X,D	EP-A-0 112 122 (SOUTH AFRICAN INVENTIONS DEVELOPMENT CORP.) * Revendications 1,5,19; page 1, paragraphe 3; page 5, paragraphe 1 * ---	1,5,6	
X	DIALOG 86-06166 PHARMACEUTICAL NEWS INDEX: FDC REPORTS: "The Pink Sheet", vol. 48, no. 5, pages 8-10 * Résumé * ---	1,2,9, 10,11, 17	
X	BIOLOGICAL ABSTRACTS/RRM, AN-28103065; A.S. HESTER: "Superoxide dismutase gets hotter at bio-technology general", & GENET. TECHNOL. NEWS, 1985, vol. 5, no. 1, p2 * Résumé * ---	1,3	
P,X D	GB-A-2 176 702 (THE WELLCOME FOUNDATION) * Revendications 1-3,21; figures 1,2 * ---	1,4,5,6 ,7	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4) A 61 K
P,X D	GB-A-2 176 703 (THE WELLCOME FOUNDATION) * Revendications 1,2,3,22; figures 1,2 * -----	1,4,5,6 ,7	

Date d'achèvement de la recherche

19-06-1989

Examineur

PEETERS J.C.

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

X : particulièrement pertinent à lui seul
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie
A : arrière-plan technologique
O : divulgation non-écrite
P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons

& : membre de la même famille, document correspondant

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

BE 8700510
BO 316

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 28/06/89
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0123304	31-10-84	JP-A- 59196824	08-11-84
		CA-A- 1206434	24-06-86
		US-A- 4552760	12-11-85
EP-A- 0112122	27-06-84	AU-B- 554862	04-09-86
		AU-A- 1029683	21-06-84
		JP-A- 59110625	26-06-84
		JP-A- 59118717	09-07-84
GB-A- 2176702	07-01-87	AU-B- 567236	12-11-87
		AU-A- 5796486	04-12-86
		AU-B- 569429	28-01-88
		AU-A- 5796586	04-12-86
		BE-A- 904830	27-11-86
		BE-A- 904831	27-11-86
		CH-B- 665356	13-05-88
		CH-B- 664495	15-03-88
		DE-A, C 3617752	04-12-86
		DE-A, C 3617753	04-12-86
		FR-A- 2583984	02-01-87
		FR-A- 2593393	31-07-87
		GB-A, B 2176703	07-01-87
		JP-A- 62026233	04-02-87
		JP-A- 62026234	04-02-87
		LU-A- 86444	05-12-86
		LU-A- 86445	05-12-86
		NL-A- 8601354	16-12-86
		NL-A- 8601355	16-12-86
		SE-A- 8602404	29-11-86
		SE-A- 8602405	29-11-86
GB-A- 2176703	07-01-87	AU-B- 567236	12-11-87
		AU-A- 5796486	04-12-86
		AU-B- 569429	28-01-88
		AU-A- 5796586	04-12-86
		BE-A- 904830	27-11-86
		BE-A- 904831	27-11-86
		CH-B- 665356	13-05-88
		CH-B- 664495	15-03-88

EPO FORM P043

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

BE 8700510
B0 316

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 28/06/89

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
GB-A- 2176703		DE-A, C 3617752	04-12-86
		DE-A, C 3617753	04-12-86
		FR-A- 2583984	02-01-87
		FR-A- 2593393	31-07-87
		GB-A- 2176702	07-01-87
		JP-A- 62026233	04-02-87
		JP-A- 62026234	04-02-87
		LU-A- 86444	05-12-86
		LU-A- 86445	05-12-86
		NL-A- 8601354	16-12-86
		NL-A- 8601355	16-12-86
		SE-A- 8602404	29-11-86
		SE-A- 8602405	29-11-86