

⑲ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

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

**2 671 973**

⑫ N° d'enregistrement national :

**91 00863**

⑤ Int Cl<sup>s</sup> : A 61 K 37/547

⑫

**DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

**A1**

⑫② Date de dépôt : 25.01.91.

⑫③ Priorité :

⑫④ Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 31.07.92 Bulletin 92/31.

⑫⑤ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑫⑥ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *FONDATION NATIONALE DE  
TRANSFUSION SANGUINE — FR.*

⑦② Inventeur(s) : *Trouve Renaud, Kichenin-Martin  
Violaine et Stucker Olivier.*

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire : *Cabinet Regimbeau Martin Schrimpf  
Warcoin Ahner.*

⑤④ Utilisation de la protéine C activée comme agent anti-agrégant plaquettaire.

⑤⑦ La présente invention concerne l'utilisation de la  
Protéine C Activée comme anti-agrégant plaquettaire ainsi  
que les compositions pharmaceutiques contenant à titre de  
principe actif la Protéine C Activée.

**FR 2 671 973 - A1**



L'invention concerne l'utilisation de la Protéine C Activée comme antiagrégant plaquettaire.

La Protéine C est le précurseur d'une sérine protease vitamine K dépendante (PM 62000) présente dans le plasma à une concentration de  
5 2000 U/litre.

Cette protéine est physiologiquement clivée par la thrombine et donne naissance à la Protéine C Activée (PCA ; PM 57000) dont l'action principale est l'inactivation de co-facteurs de la coagulation. L'activation de la Protéine C est accélérée par la thrombomoduline. La Protéine S (PM  
10 69000, concentration 35 mg/litre), en large excès dans le plasma par rapport à la PCA, est le co-facteur de la Protéine C Activée. Son rôle est d'augmenter l'efficacité catalytique de celle-ci.

Les modes d'action de la PCA sont décrits dans la littérature dans deux domaines :

15 1. Sur la coagulation, par lyse des facteurs V activés et VIII activés, entraînant une diminution de la génération de thrombine. La PCA peut alors être utilisée comme médicament des déficiences en antithrombine III ou en Protéine C et en CIVD (coagulation intravasculaire disséminée).

20 2. Sur les systèmes fibrinolytiques par interaction avec différents inhibiteurs de la fibrinolyse :  $\alpha_1$  antitrypsine, inhibiteur de l'activateur du plasminogène. Dans ce cas, la PCA peut être utilisée comme médicament des troubles de la fibrinolyse.

Bien que ces activités connues de la PCA la rende potentiellement utile dans la prévention des thromboses, elle n'a jamais été utilisée  
25 comme tel, à grande échelle.

En effet, jusqu'à ce jour, ce sont les héparines qui demeurent les molécules les plus couramment utilisées, tant sur la plan curatif des thromboses veineuses et artérielles, que sur le plan préventif des accidents  
30 thrombo-emboliques, chez les sujets à risque.

Toutefois, l'utilisation des héparines de façon systématique conduit à des résistances à l'héparine et/ou à des réactions à l'héparine qui empêchent leur utilisation, notamment les thrombocytopenies.

D'un autre côté, bien que l'utilisation d'agents anti-agrégants plaquettaires ait été suggérée pour le traitement de certaines pathologies jusqu'à ce jour, peu de molécules à l'exception des molécules de dipyridamole, sulfinpyrazone et ticlopidine ont été identifiées comme  
5 anti-agrégants plaquettaires. Ces molécules présentent toutefois des effets indésirables caractérisés surtout par des troubles digestifs ou réactions allergiques, une utilisation à dose progressive et une demi-vie relativement longue.

Il convient de rappeler que les interactions plaquettaires avec  
10 la paroi vasculaire et entre plaquettes elles-mêmes sont de trois types : 1) attachement à la paroi sans changement de conformation, 2) étalement avec changement de conformation et début des interactions entre plaquettes, 3) cohésion entre plaquettes étalées et les autres plaquettes circulantes, (Sakariassen et al., 1989).

15 Sont définies comme adhérentes, les plaquettes en interactions de types 1 et 2, et comme plaquettes agrégées les plaquettes en interaction de type 3.

Le passage entre les différents types d'interaction implique la mise en oeuvre de mécanismes cellulaires et membranaires différents.

20 Il est possible de quantifier l'adhésion plaquettaire in vivo par étude morphométrique (sections histologiques) ou par accumulation de plaquettes radiomarquées dans des conditions qui ne déclenchent pas d'interaction entre les plaquettes.

La présente invention concerne plus particulièrement  
25 l'utilisation de la Protéine C Activée PCA pour la réalisation d'une composition pharmaceutique utile comme antiagrégant plaquettaire. Grâce à cette activité anti-agrégant plaquettaire et à ses activités annexes, la PCA est utilisable dans les cinq pathologies suivantes :

30 . phase aigüe de l'infarctus du myocarde, où l'effet primaire de la PCA sur l'agrégation plaquettaire peut être complétée par une potentialisation de la fibrinolyse et par un effet anti-coagulant. Ceci est particulièrement important en cas de saignements induits par les fibrinolytiques classiques.

. les contre-indications à l'héparine, ou résistances à l'héparine.

- . l'attaque cérébrale
- . l'embolie pulmonaire et les thrombus périphériques
- 5 . la prévention et le traitement des obstructions microcirculatoires.

Les compositions pharmaceutiques de la présente invention sont plus particulièrement des compositions injectables, contenant de préférence de 0,01 à 10 000 U de PCA par dose.

10 La PCA peut être obtenue par des technologies de fractionnement à partir de fraction sanguine et activation de la PC obtenue. Le brevet FR 89 04814 décrit un procédé d'obtention de Protéine C Activée mais il est possible d'obtenir ce produit par d'autres technologies, notamment par recombinaison génétique. Le produit est notamment vendu  
15 par la Société Stago.

Parmi les compositions selon la présente invention, il faut citer plus particulièrement les compositions associant la PCA et l'ATIII et/ou des activateurs du plasminogène tels que le tPA naturel ou recombinant et les autres fibrinolytiques dérivés ou non de l'urokinase et  
20 de la streptokinase qui donnent des résultats tout à fait intéressants comme cela ressortira des exemples ci-après.

L'influence de la Protéine C Activée sur l'hémostase primaire démontrée ci-après dans les exemples :

25 1. in vivo, à partir d'un modèle dit de "thrombus dans l'artère mésentérique de rat", décrit par Bourgain et al. (1986).

2. in vitro, par l'utilisation de l'agrégation plaquettaire sur des plasmas riches en plaquettes (PRP) humains ou animaux testée sur agrégomètre.

30 Le dépôt plaquettaire, incluant tous les types d'interaction plaquettaire, est défini comme le nombre de plaquettes radiomarquées par unité de surface.

Les mesures globales de quantité de radioactivité déposée dans un vaisseau ou un tube évaluent toujours l'adhésion et non la somme (adhésion + agrégation) car si la mesure n'est pas rapportée à une unité de surface, la part de l'agrégation n'est pas évaluable.

5 (Elles évaluent l'adhésion plaquettaire et non le dépôt plaquettaire).

In vivo, nous avons contourné cette difficulté en mesurant directement la taille du thrombus en vidéomicroscopie, ce que revient à faire une coupe histologique dans un plan et la surveiller en fonction du temps. Par définition, un thrombus est une accumulation de plaquettes de  
10 plus de 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur et contient forcément des plaquettes agrégées entre elles.

Il existe une autre approche : l'agrégométrie in vitro où peuvent être discernées les différentes phases :

- 1) changement de forme,
- 15 2) agrégation primaire (interaction entre plaquettes réversible),
- 3) agrégation secondaire irréversible.

Cette technique donne une image directe de l'agrégation ou de son inhibition et nous l'avons utilisée comme méthode de mise en  
20 évidence des effets directs in vitro de la PCA sur l'agrégation plaquettaire.

Les exemples ci-après sont destinés à mettre en évidence d'autres avantages et caractéristiques de la présente invention.

La figure 1 schématise l'action de la PCA sur l'agrégation plaquettaire du PRP humain in vitro,

25 (pente et pourcentage d'agrégation pour différente concentration de PCA)

- a) d'origine Stago
- b) PCA d'origine CNTS.

La figure 2 schématise les mêmes types de paramètres que la figure 1, mais en utilisant un mélange PRP de lapin - PCA Stago ajouté en  
30 quantité croissante de PCA pour un volume final de 200  $\mu\text{l}$ .

La figure 3 reprend les paramètres de la figure 2 mais :

a) pour l'ATIII (en quantité croissante 200 µl)

b) pour la PCA + ATIII (à 15 et 20 µl)

### Exemple 1

#### Modèle in vivo

5

Modèle dit "de thrombus dans l'artère mésentérique de rat".

Dans ce modèle l'induction du thrombus se fait par de l'ADP (adénosine diphosphate). Il consiste à microdisséquer une artère mésentérique d'un rat après avoir placé une anse intestinale dans une chambre d'observation. Après une période de stabilisation, une petite portion de  
10 cette artère est stimulée par un courant électrique. Cette stimulation a pour but de détruire l'endothélium afin qu'il ne puisse plus exercer son pouvoir anti-agrégant.

Lorsque l'on met l'artère en contact avec de l'ADP, il se forme au niveau du point de stimulation un agrégat plaquettaire qui peut aller  
15 jusqu'à l'obstruction du vaisseau. A l'arrêt de la stimulation par l'ADP, le thrombus se désagrège. Il peut être ainsi réalisé sur un même artériole une douzaine de thrombus.

Les animaux contrôles reçoivent le sérum physiologique seul. Durant toute l'expérimentation la formation des thrombus est enregistrée  
20 sur bande vidéo. Pour suivre la formation du thrombus, on place sur le site de formation du thrombus une fenêtre électronique dans laquelle on enregistre la formation du thrombus qui apparaît blanc sur fond rouge puisqu'il ne contient pas d'hémoglobine. La vitesse de formation de ce thrombus est l'un des critères d'évaluation d'activité du produit étudié.

25 L'expérience montre que dans sa phase de formation, la cinétique est assimilable à une droite.

A titre d'essai, l'effet de l'aspirine et de l'héparine ont été étudiés sur la vitesse de formation du thrombus.

L'aspirine a été injectée en i.v. à raison de 10 mg/kg puis  
30 l'héparine (500 UI/kg en I.V.).

L'aspirine et l'héparine ont induit une diminution de la vitesse

de formation du thrombus. Les pentes moyennes pour les "contrôles", les "aspirine" et les "héparine" sont respectivement de 2,13, 1,28 et 0,98. Soit 40% et 54% de diminution par rapport aux contrôles.

Ceci met en évidence une activité pharmacologique sur la formation de l'agrégat plaquettaire.

Etude in vivo de l'influence de la Protéine C sur l'hémostase primaire.

Après le thrombus de contrôle on réalise 3 thrombus témoins puis on traite l'animal par injection i.v. via le cathéter inséré dans la veine jugulaire. Les animaux traités reçoivent 50 unités antigènes de Protéine C Activée dans 0,9 ml en deux minutes puis 1 unité par minute durant vingt minutes.

Cette étude a été réalisée avec une PCA CNTS obtenue par le procédé du brevet 89 04814. Selon les spécifications fournies, ce produit contient 57 unités antigènes par ml et 0,3 unité de thrombine.

Huit rats ont été utilisés pour cette étude, quatre pour le groupe contrôle et quatre pour le groupe traité.

	Manip.	Pente avant traitement (Po)	Pente après traitement (P)	P/Po %	
20	CONTROLES	Th2	0.006291	0.006636	105.47
		Th3	0.001275	0.001126	88.32
		Th8	0.003294	0.002841	86.25
		Th10	0.001249	0.001126	90.15
25				Moyenne esm	92.55 4.38
	TRAITES	Th4	0.011964	0.010134	84.70
		Th6	0.006356	0.000972	15.30
		Th7	0.004695	0.002035	43.34
30		Th9	0.006957	0.003162	45.45
				Moyenne esm	47.20 14.26

Les résultats mettent en évidence un ralentissement significatif de la vitesse de formation du thrombus plaquettaire artériel après traitement par la PCA. Ce ralentissement est de l'ordre de 50%.

### Exemple 2

5

#### Modèles in vitro

Inhibition de l'agrégation plaquettaire sur des plasmas riches en plaquettes (PRP) obtenue à partir de plasmas animaux et humains.

#### 1. Plasma humain

Deux PCA ont été testées : PCA Stago et PCA CNTS (Fig. 1).

10

En analysant les résultats, une inhibition nette de l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP provoquée par la PCA Stago et une moindre réaction due à la PCA CNTS sont observées. Le témoin spécifique PRP/Thrombine montre que les chiffres obtenus sont représentatifs de la thrombine résiduelle présente dans la PCA actuelle du CNTS.

15

#### 2. Plasma de lapin

La PCA d'origine humaine (Stago) a également une action sur les plaquettes de lapin (fig. 2), ce qui permet d'envisager l'utilisation de cet animal pour les essais in vivo des préparations de PCA à visée thérapeutique.

20

Sur ce même PRP de lapin, l'effet d'une antithrombine III d'origine humaine (ATIII) a été testé (fig. 3). L'antithrombine III seule sur les plaquettes ne présente aucune action notable anti-agrégante. Pensant à une association thérapeutique de produits, une action complémentaire éventuelle de PCA + ATIII sur les plaquettes a été testée.

25

Si l'AT-III seule n'a pas d'effet notable sur l'agrégation plaquettaire de plasma de lapin, par contre il est tout à fait net que les mélanges PCA + AT III, incubés pendant 3 min. à 37°C en présence de PRP inhibent l'agrégation plaquettaire de ce plasma de façon plus accentuée que la PCA seule ; il semble donc qu'il y ait une potentialisation de l'action de

30

la PCA par la présence d'AT-III.

Après une phase d'agrégation survient une phase de désagrégation.

Il est possible d'associer la PCA avec des activateurs de plasminogène dont l'action est potentialisée.

35



REFERENCES

Bourgain, R.M., Maes, L. et Andries, R. (1986) : Artériel thrombin studied in vivo. A model and some applications. In Biology, and pathology of platelet. Vessel wall interaction. Academy Press.

5            Sakariassen, K.S., Muggli, R. et Baumgartner, R. (1989) :  
Measurements of platelet interaction with components of the vessel wall in  
flowing blood. Methods in Enzymology, 169 : 37-43.

10

15

20

25

30

35

### REVENDEICATIONS

1. Utilisation de la Protéine C Activée (PCA) dans la réalisation de compositions pharmaceutiques à activité anti-agrégante plaquettaire.
- 5 2. Utilisation selon la revendication 1 caractérisée en ce que la PCA est d'origine recombinante.
3. Utilisation selon 1 caractérisée en ce que la PCA est extraite à partir de plasmas sanguins d'origine humaine ou animale.
- 10 4. Utilisation selon 1 et 2 caractérisée en ce que la Protéine C est activée par la thrombine.
5. Utilisation selon 3 caractérisée en ce que la composition est administrable par voie injectable.
6. Utilisation selon 5 caractérisée en ce que la composition contient une quantité de PCA comprise entre 0,01 unité par dose et 10 000  
15 unités par dose.
7. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisée en ce qu'il s'agit de traiter la phase aïgue de l'infarctus du myocarde.
8. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisée en ce qu'il s'agit de traiter ou prévoir la formation de thrombus chez les  
20 patients résistant à l'héparine et/ou chez lesquels l'héparine est contre-indiquée.
9. Utilisation selon 1 à 6 caractérisée en ce qu'il s'agit de traiter l'attaque cérébrale.
10. Utilisation selon 1 à 6 caractérisée en ce qu'il s'agit de  
25 traiter l'embolie pulmonaire et le thrombus périphérique.
11. Utilisation selon 1 à 6 caractérisée en ce qu'il s'agit de prévenir et traiter les obstructions microcirculatoires.
12. Composition pharmaceutique contenant à titre de principe actif la Protéine C Activée.
- 30 13. Composition pharmaceutique contenant à titre de principes actifs un mélange de Protéine C Activée et d'antithrombine III.

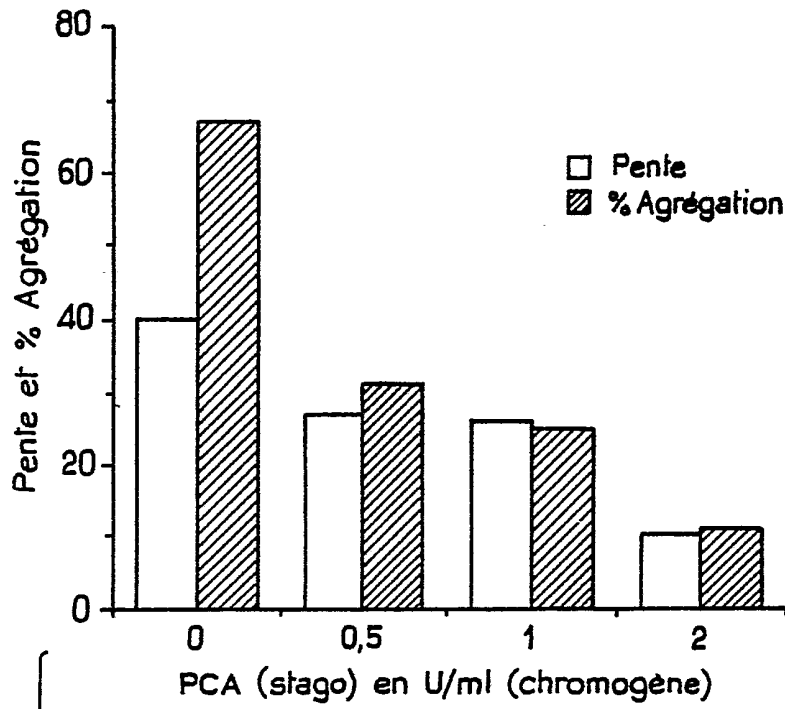
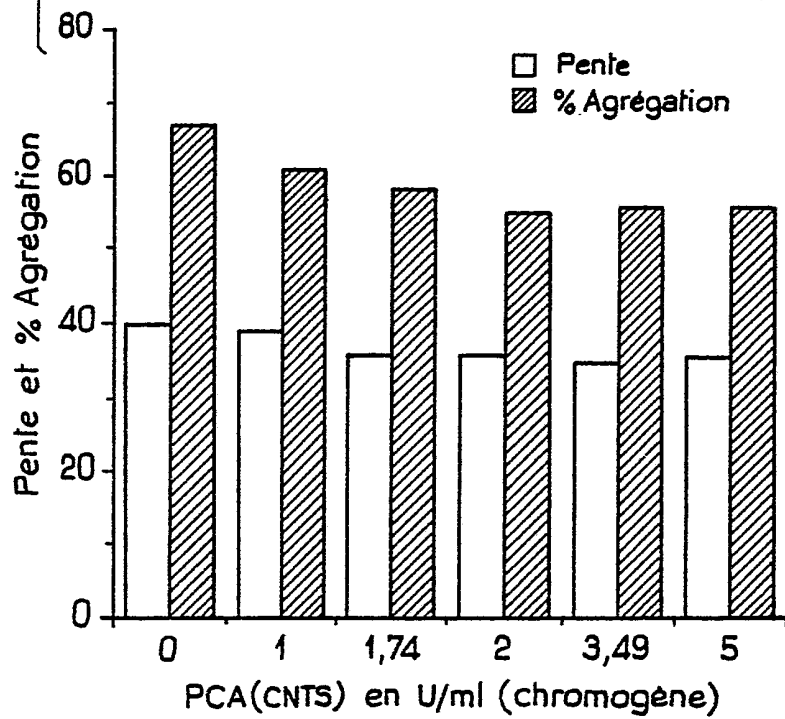


FIG.1

a



b

2 / 3

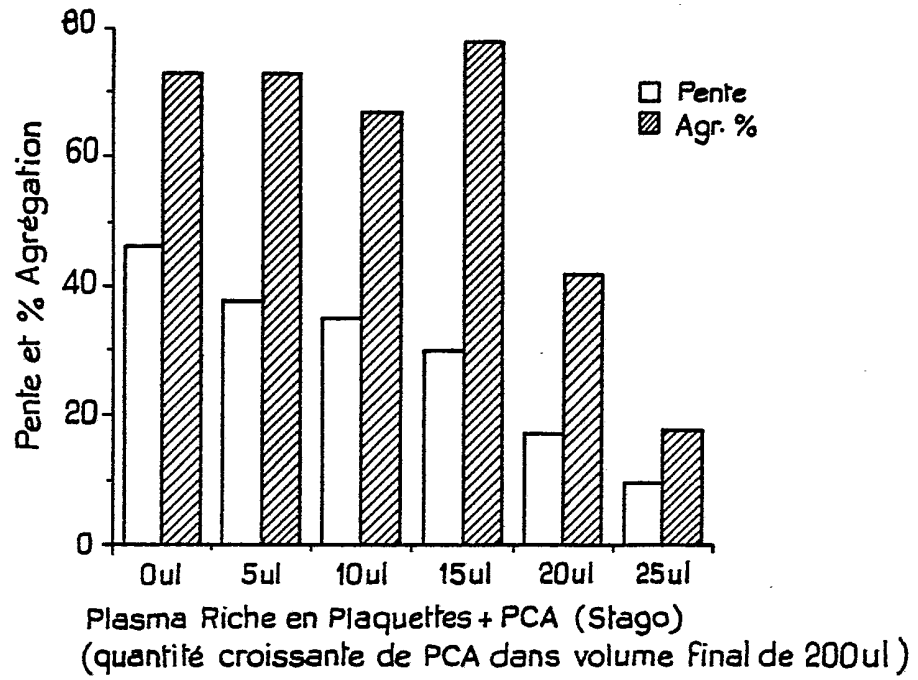
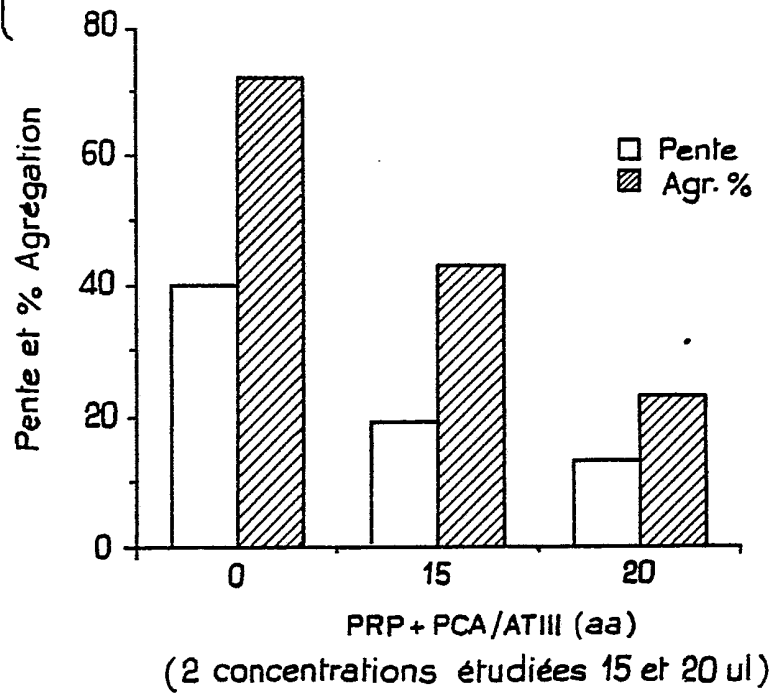
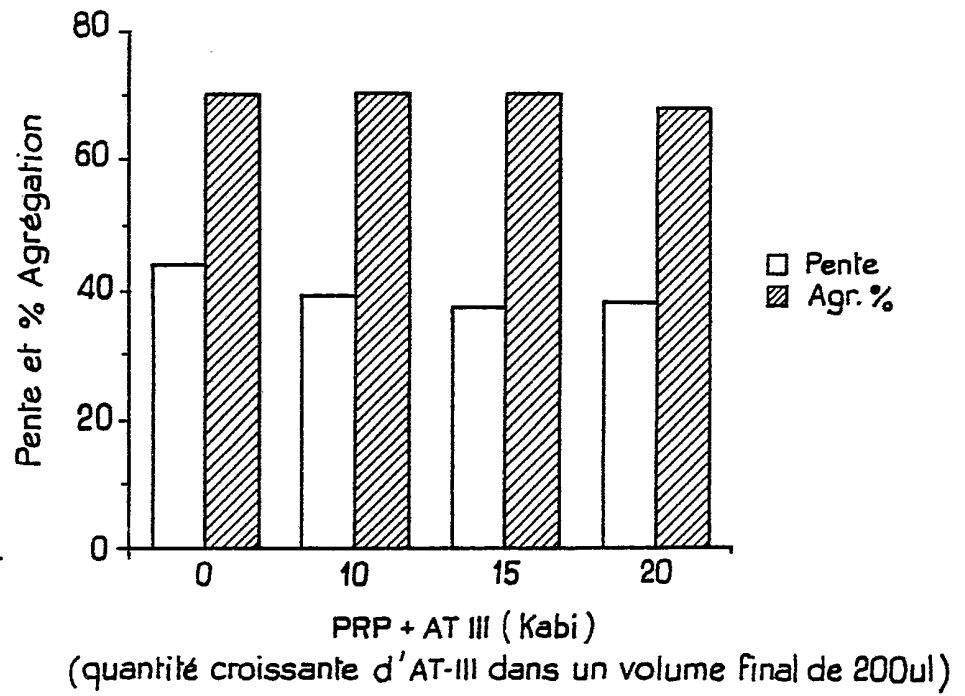
FIG. 2

FIG. 3



INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE**  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

FR 9100863  
FA 451976

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	EP-A-0 326 014 (HOECHST JAPAN) * Page 3, ligne 20 - page 4, ligne 48 * ---	1-13
X	WO-A-8 902 747 (THE AMERICAN NATIONAL RED CROSS) * Page 4, lignes 5-9 * ---	1-12
X	EP-A-0 318 201 (SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION) * Page 1, résumé * ---	1-12
X	EP-A-0 357 296 (THE WELLCOME FOUNDATION) * Page 2, lignes 37-39; page 4, lignes 13-20 * -----	1-12
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		A 61 K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
27-08-1991		TURMO Y BLANCO C.E.
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b> 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 (P0412)