

Fragment recombinant du facteur von Willebrand : un nouvel antithrombotique artériel

Alain Schreiber
Christopher Prior
Michael Hrinda
Jacquelynn Cook
Mark Perrone
André Uzan
Zaverio Ruggeri

L'adhérence des plaquettes à des endothéliums lésés met en jeu plusieurs systèmes, dont l'interaction des glycoprotéines plaquettaires GP Ib et GP IX avec le facteur von Willebrand. Le domaine de ce facteur responsable de la liaison à la GP Ib a été identifié et produit avec une grande efficacité par génie génétique. Ce fragment se comporte comme un puissant anti-agrégant plaquettaire et un efficace anti-thrombotique sur des modèles animaux. Quoique sa demi-vie soit brève (environ 1 heure), ce produit pourrait se révéler un médicament utile en cas de menace aiguë de thrombose artérielle.

ADRESSES

A. Uzan : responsable, unité thrombose, Rhône Poulenc Rorer, Centre de Recherche de Vitry-Alfortville, 13 quai Jules Guesdes, BP 14, 94403 Vitry-sur-Seine Cedex, France. A. Schreiber : Directeur général adjoint recherche et développement. C. Prior : assistant, unité procédés biologiques. J. Cook : assistante, unité cardiovasculaire. M. Perrone : responsable programme cardiovasculaire. Rhône Poulenc Rorer, 500 Arcola Road, Colledgeville PA 19426, États-Unis. Z. Ruggeri : directeur, département de recherche sur artériosclérose et thrombose. Research Institute of Scripps clinic, 10666 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, États-Unis.

L'adhérence des plaquettes sanguines au sous-endothélium, lorsque ce dernier est exposé au sang circulant à la suite d'une lésion de la paroi vasculaire, représente une étape essentielle non seulement pour le maintien de l'hémostase primaire, mais également dans la pathogenèse des accidents thrombo-emboliques. Lorsque les stimuli biochimiques résultant d'une lésion vasculaire sont suffisamment puissants, les plaquettes adhérentes s'agrègent rapidement pour former des thrombi de taille modérée. Ces thrombi sont stabilisés par l'activation concomitante de la cascade d'enzymes de la coagulation

et la production d'un réseau de fibrine qui relie les plaquettes entre elles de façon irréversible. La taille et la composition de ces thrombi varient selon la localisation anatomique des vaisseaux et selon les forces rhéologiques en présence. L'élément plaquettaire prédomine dans les thromboses artérielles, alors que la production de thrombine et la fibrinoformation sont plus importantes dans les thromboses veineuses.

La thrombogenèse

Dans le contexte de l'hémostase physiologique, l'adhérence plaquettaire au sous-endothélium vasculaire

et la formation du « clou hémostatique » sont des facteurs autolimitants permettant de préserver l'intégrité de la circulation sanguine.

En revanche, une thrombogénèse intravasculaire incontrôlée peut être à l'origine d'occlusion de vaisseaux de petit calibre responsables d'infarctus locaux, ou entraîner la production d'embolies distales à partir du site de formation du *thrombus*.

La prévention et le traitement des thromboses veineuses sont assurés de façon satisfaisante par des médicaments, telles l'héparine ou les héparines de bas poids moléculaire, qui inhibent à la fois la thrombine et sa production. Il n'en est pas de même pour la prévention et le traitement des thromboses artérielles, lesquelles posent aujourd'hui encore de graves problèmes cliniques justifiant la recherche de nouveaux moyens thérapeutiques.

On sait que lorsqu'elles adhèrent à la paroi artérielle, les plaquettes sont activées, devenant ainsi aptes à lier le fibrinogène et à présenter une surface procoagulante. Ces phénomènes sont à l'origine de l'agrégation plaquettaire, de la stabilisation du *thrombus*, et de sa croissance.

L'adhérence et l'agrégation plaquettaire impliquent des facteurs biochimiques (figure 1) que cherchent précisément à inhiber les médicaments dits antiplaquettaires tels l'aspirine, inhibiteur de la cyclo-oxygénase, les inhibiteurs de la thromboxane synthétase ou encore la ticlopidine, dont le mécanisme d'action demeure encore controversé. Ces médicaments, actuellement utilisés dans la prévention des thromboses artérielles ou dans le cas des inhibiteurs de la thromboxane synthétase en cours d'études cliniques, ne produisent cependant que des effets thérapeutiques partiels.

Par ailleurs, les héparines et les inhibiteurs de la thrombine, dont l'action s'exerce sur la cascade de réactions conduisant à la formation de fibrine, n'ont également qu'une efficacité limitée et comportent un risque de diathèse hémorragique. En outre, les héparines ne semblent pas, aux doses thérapeutiques habituelles, capables d'inhiber la thrombine liée à un *thrombus* constitué, ce qui limite leur action dans le cas des thromboses artérielles.

m/s n° 10 vol. 8, décembre 92

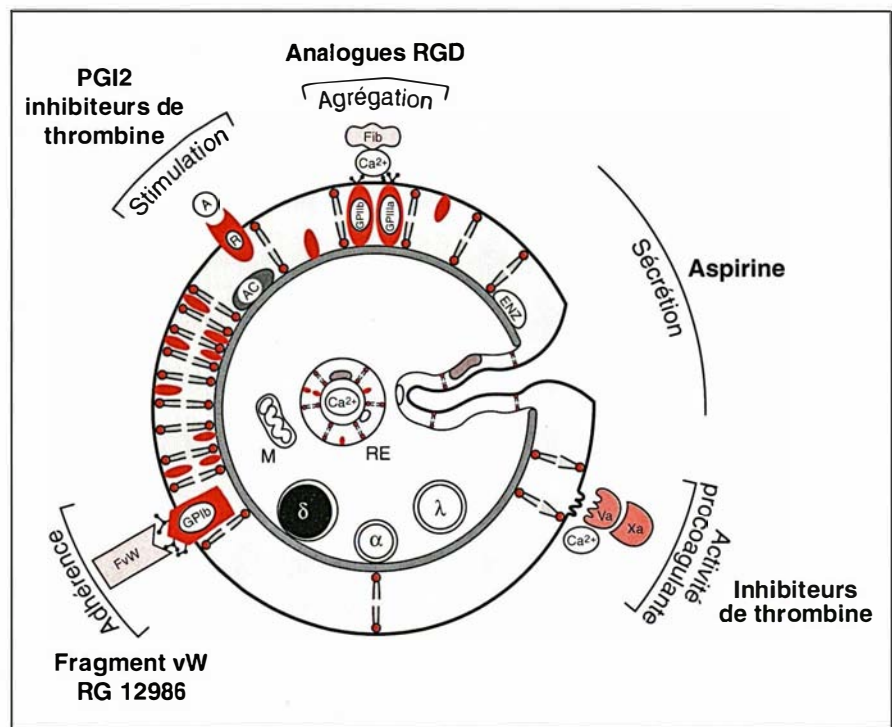


Figure 1. **Représentation schématique d'une plaquette, décrivant les fonctions plaquettaires connues et leurs inhibiteurs.** RG 12986 empêche l'adhérence initiale des plaquettes au sous-endothélium en inhibant l'interaction entre le fvW et la GP Ib. A : agoniste, dans le cas présent la thrombine ; Enz : enzyme, dans le cas présent, la cyclo-oxygénase ; PGI 2 : prostacycline ; α : granule de sécrétion riche en protéines (facteur 4 plaquettaire) ; λ : granule de sécrétion, fonction mal définie ; δ : granule de sécrétion dit granule dense (ADP, SHT, Ca) ; RGD : motif Arg-Gly-Asp ; Fib : fibrinogène ; AC : adénylate cyclase ; M : mitochondrie ; RE : réticulum endoplasmique (sites de stockage du calcium) ; Va et Xa : facteurs V et X activés ; Ca^{2+} : calcium ionisé ; R : récepteur.

En raison de l'efficacité limitée des moyens thérapeutiques actuels dans le traitement et la prévention des thromboses artérielles, une nouvelle approche thérapeutique reposant sur l'inhibition spécifique et réversible de l'adhésivité plaquettaire paraît prometteuse.

Le présent article a pour objet de présenter un nouveau type de médicament dont la caractéristique est d'inhiber l'interaction d'une glycoprotéine qui fait partie du groupe des protéines adhésives, le facteur von Willebrand (fvW), avec ses récepteurs plaquettaires, lesquels sont des glycoprotéines appartenant à la famille des intégrines.

Stratégie antithrombotique

Le choix de cette stratégie, en vue de la prévention des thromboses artérielles, est lié aux progrès réalisés dans la connaissance des récepteurs glyco-

protéiques des plaquettes et de leurs ligands endogènes, en particulier le fvW [1].

L'adhérence plaquettaire implique l'interaction simultanée du fvW avec, d'une part, le complexe membranaire glycoprotéique GP Ib-GP IX (GP Ib-IX) et, d'autre part, certains constituants du sous-endothélium vasculaire tels que les fibrilles de collagène et les héparan-sulfates.

La GP Ib forme un complexe monovalent avec la GP IX au niveau de la membrane plaquettaire [2,3]. Une plaquette normale comporte environ 25 000 unités de ce complexe qui se comporte comme un récepteur pour le fvW, pour autant qu'il y ait une liaison de la plaquette au sous-endothélium par l'intermédiaire du fvW et la présence d'une force circulatoire suffisante. Cette interaction entre le fvW et son complexe récepteur est physiologiquement contrôlée, leur liaison ne se produisant que lors

RÉFÉRENCES

1. Kurnicki JJ. Platelet membrane glycoproteins and their function : an overview. *Blut* 1989 ; 59 : 30-4.
2. Berndt MC, Gregory C, Kabral A, Zola H, Fournier D, Castaldi P. Purification and preliminary characterization of the GP Ib complex on the human platelet membrane. *Eur J Biochem* 1985 ; 151 : 637-43.
3. Marguerie G, Berthier R, Dupperay A, Hudry-Clergeon G, Uzan G. Les adhésines cellulaires : variations sur un thème. *médecine/sciences* 1987 ; 3 : 326-33.
4. Phillips DR, Charo F, Parise LV, Fitzgerald LA. The platelet membrane GPIIb-IIIa complex. *Blood* 1988 ; 71 : 831-43.
5. Nurden AT. Congenital abnormalities of platelet membrane glycoproteins. In : Kunicki TJ, George JN, eds. *Platelet Immunobiology Molecular and Clinical Aspects*. Philadelphia : Lippincott, 1989 : 63-96.
6. Ruggeri ZM, Zimmerman TS. VWF and VW disease. *Blood* 1987 ; 70 : 895-903.
7. Coller BS. Platelets and thrombolytic therapy. *N England J Med* 1990 ; 322 : 33-42.
8. Fujimura Y, Titani K, Holland LZ, et al. A reduced and an alkylated 52/48 kDa fragment beginning at residue 449 contains the domain interacting with GPIb. *J Biol Chem* 1986 ; 381-5.
9. Sporn LA, Chavin SI, Marder VJ, Wagner DD. Biosynthesis of VWF protein by human megakaryocytes. *J Clin Invest* 1985 ; 76 : 1102-6.
10. Jaffe EA, Hoyer FW, Nachman RL. Synthesis of VWF by cultured endothelial cells. *Proc Natl Aca Sci USA* 1974 ; 71 : 1906-20.

d'une lésion de l'intima. A l'état normal, le fvW n'interagit pas avec les plaquettes. C'est pourquoi, lorsque l'on veut étudier *in vitro* la liaison du fvW aux plaquettes, il est indispensable soit d'introduire dans la préparation plaquettaire des facteurs exogènes d'activation telles la ristocétine (antibiotique) ou encore la botrocétine (protéine de venin de serpent), soit d'hydrolyser préalablement les acides sialiques du fvW. Ces réactions, découvertes empiriquement, tendent sans doute à mimer *in vitro* le changement de conformation du fvW qui, *in vivo*, permet la reconnaissance du récepteur GP Ib-IX. Par ailleurs, l'agrégation plaquettaire est sous la dépendance d'un autre complexe glycoprotéique membranaire GP IIb-IIIa [3, 4]. Ce complexe devient fonctionnel lorsque les plaquettes sont activées, soit à la suite de leur adhérence, soit par l'intermédiaire d'agents biochimiques libérés au niveau d'une lésion vasculaire, telles la thrombine, l'adrénaline ou la sérotonine. Les récepteurs GP IIb-IIIa reconnaissent le motif canonique tétrapeptidique arginine-glycine-aspartate-sérine (ou valine) présent dans la famille des protéines dites cyto-adhésines, qui comprend le fibrinogène, la fibronectine, la vitronectine ainsi que le fvW (motif RGDS). Un certain nombre de maladies d'origine génétique témoignent de l'importance des facteurs impliqués dans l'adhérence et l'agrégation plaquettaire [5]. La thrombasthénie de Glanzman est un syndrome héréditaire de déficience fonctionnelle de la GP IIb-IIIa se traduisant par un temps de saignement prolongé et une diathèse hémorragique malgré une thrombocytose normale. Cette maladie est caractérisée par une incapacité de liaison du fibrinogène aux plaquette et une inaptitude de celles-ci à s'agréger. Dans la maladie de Jean Bernard et Soulier, une déficience génétique de la GP Ib empêche la liaison du fvW et l'adhérence plaquettaire. La maladie hémorragique de von Willebrand est hétérogène quant à ses manifestations cliniques et hématologiques [6]. Plus de 20 sous-types de cette maladie ont été décrits selon la localisation des lésions génétiques du fvW, lesquelles peuvent provoquer

des troubles fonctionnels de sévérité variable mais dont le dénominateur commun est une tendance hémorragique excessive et l'absence d'incidents thrombotiques.

Inspirés par l'étiologie de la maladie de Jean Bernard et Soulier et de la maladie de von Willebrand, et compte tenu de l'action très sélective du fvW au niveau plaquettaire, nous avons choisi de prendre pour cible, dans notre approche thérapeutique, la liaison spécifique du fvW au récepteur GP Ib-IX.

Initialement, en l'absence de petites molécules synthétiques ou naturelles qui auraient pu constituer un point de départ, les anticorps monoclonaux nous sont apparus comme des prototypes moléculaires attrayants. Le développement clinique précoce de l'anticorps monoclonal 7E3, dirigé contre le complexe GP IIb-IIIa, semblait confirmer un tel choix [7]. Dans un premier temps, un anticorps monoclonal capable d'inhiber la liaison du fvW aux plaquettes a été produit, mais il est apparu que pour neutraliser complètement l'interaction du fvW circulant avec les plaquettes au niveau de la lésion vasculaire, se poseraient des problèmes de posologie. C'est pourquoi des anticorps monoclonaux dirigés contre le complexe GP Ib-IX ont été préparés. De tels anticorps, hautement sélectifs et puissants, se sont avérés aptes à inhiber la liaison du fvW au récepteur GP Ib-IX. Cependant, les anticorps monoclonaux d'origine murine présentent l'inconvénient d'induire chez l'homme une réponse immunitaire de type anti-immunoglobuline de souris, susceptible d'entraîner des réactions allergiques, limitant ainsi la possibilité d'administrations répétées. Certes, il est techniquement possible d'humaniser l'anticorps murin par recombinaison génétique. Ce type de manipulation a déjà été réalisé pour l'anticorps 7E3 mentionné ci-dessus. Cela réduit la réponse immunitaire chez l'homme, mais n'élimine pas la possibilité d'une réponse anti-idiotypique, limitant encore la possibilité d'administrations répétées. Un autre inconvénient majeur de l'utilisation des anticorps monoclonaux nous a été enseigné par l'expérience clinique de l'anticorps 7E3. En effet,

bien que sa demi-vie soit, *in vivo*, de quelques jours, le 7E3 a provoqué, après une administration unique, une inhibition de l'agrégation plaquettaire et une prolongation du temps de saignement durant plus d'un mois. Ces effets sont difficilement contrôlables étant donné l'absence, en dehors de la transfusion de plaquettes fraîches, d'un antidote spécifique. Par ailleurs, d'autres motifs nous ont finalement incités à abandonner cette approche thérapeutique par anticorps monoclonaux. En effet, bien qu'il soit, en principe, possible de produire des quantités illimitées d'anticorps monoclonaux, leur coût de production à partir de cellules de mammifères demeure très élevé et les estimations du coût par dose se sont avérées rédhibitoires.

En outre, lorsqu'un anticorps spécifique est breveté, il est impossible d'exclure de cette propriété industrielle d'autres anticorps possédant les mêmes caractéristiques.

Au cours des années 1985 à 1988, les élégants travaux du laboratoire de Zimmerman et de ses collègues avaient conduit à l'identification du domaine de fvW interagissant avec GP Ib [8]. Nous avons alors saisi cette occasion pour créer, par génie génétique, un fragment du fvW humain capable d'agir comme compétiteur réversible du fvW au niveau plaquettaire. Le choix d'un système de production bactérienne pouvait, *a priori*, conduire à des coûts de production acceptables et l'obtention de brevets solides nous a ensuite permis d'initier un développement industriel.

Construction du fragment fvW

Le fvW est synthétisé par les mégacaryocytes [9] et les cellules endothéliales [10]. Il apparaît tout d'abord sous la forme d'un polypeptide pré-curseur (pré-pro-fvW) de 2813 acides aminés. La séquence complète du fvW a été déterminée par clonage à partir d'une librairie de cellules endothéliales [11] puis confirmée par séquençage classique de la protéine isolée [12]. La forme clivée et glycosylée du fvW donne lieu à un pro-polypeptide et ensuite à la molécule finale de 2050 acides aminés, avec 22 sites de glycosylation et un

grand nombre de ponts disulfures conduisant à une structure tridimensionnelle relativement complexe. La structure oligomérique consiste en dimères assemblés à leur tour en multimères de taille hétérogène dont le poids moléculaire peut varier de 1×10^6 à 15×10^6 .

Le fvW est présent dans le sang circulant, seul ou associé par une liaison non covalente avec le facteur VIII procoagulant, dans les corpuscules de Weibel-Palade caractéristiques des cellules endothéliales, dans les granules α des plaquettes ou bien encore intégré dans la matrice sub-endothéliale. Des fragments de fvW, obtenus par trypsinolyse contrôlée, ont été utilisés pour localiser le domaine de liaison au GP Ib-IX dans la portion comprise entre les résidus valine 449 et lysine 728 [13]. Le fragment 449-728 contient également les domaines distincts responsables de la liaison à l'héparine [14] et au collagène [15] (figure 2). La séquence a été entièrement reproduite sous la forme de peptides synthétiques de 15 acides aminés [16]. Une étude systématique de l'inhibition de la liaison à la GP Ib, confirmée systématiquement à

l'aide d'un éventail d'anticorps monoclonaux, a suggéré que cette liaison implique deux régions bien définies non contiguës du fvW, correspondant chacune à un segment de 15 résidus (474-488 et 694-708) et séparées par 205 résidus. Dans le fvW original, ces deux régions sont vraisemblablement reliées dans l'espace par les ponts disulfures. Nous avons construit un plasmide de 857 paires de nucléotides provenant de l'ADNc du fvW, qui code pour la séquence des résidus 455-733 et comprend donc le domaine de liaison à la GP Ib [17]. Ce fragment a été modifié par l'introduction des signaux de traduction, de façon à être inséré dans un vecteur d'expression contenant le gène de résistance à la kanamycine, sous le contrôle d'un système promoteur (bactériophage T7) [18]. Ce plasmide d'expression a été utilisé pour la transformation d'une souche d'*Escherichia coli* contenant la polymérase de l'ARN T7. Après analyse et sélection à petite échelle, un clone exprimant le fragment du fvW a été étudié en fermentation dans des bioréacteurs de 1 à 100 litres. Le système d'expression

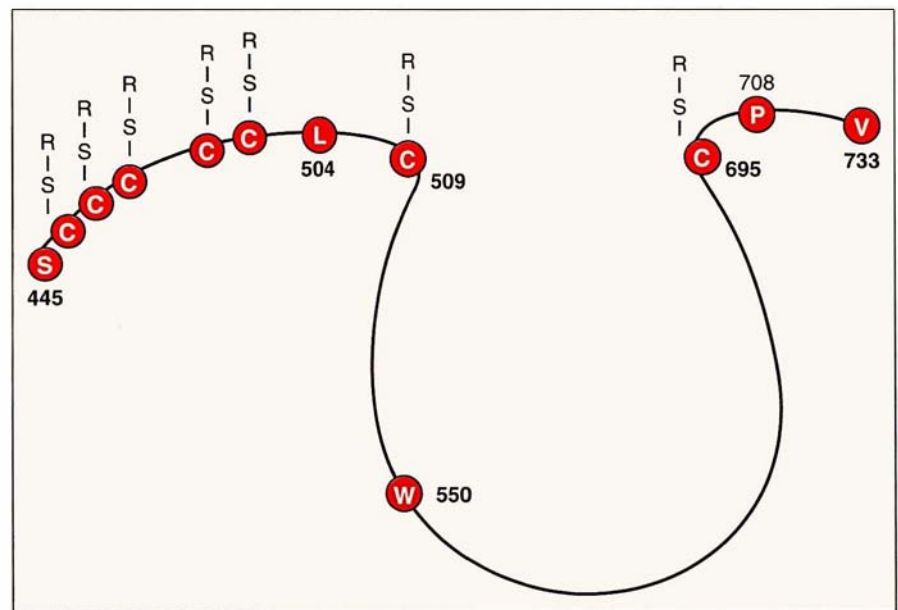


Figure 2. **RG 12986 (fvW 445-733)**. Les cystéines [7] ont été, dans la molécule recombinante, réduites et alkylées (C-S-R). Les ponts disulfures entre les cystéines 509 et 695 du fvW natif forment une boucle, nécessaire à son activité, telle qu'on la retrouve dans RG 12986.

RÉFÉRENCES

11. Lynch DC, Zimmerman TS, Collins CJ, *et al.* Molecular cloning of cDNA for human VWF. *Cell* 1985 ; 41 : 49-53.
12. Titani K, Kumar S, Takio K, *et al.* Amino acid sequence of human VWF. *Biochemistry* 1986 ; 25 : 3171-84.
13. Mohri H, Yoshioka A, Zimmerman TS, Ruggeri ZM. Isolation of the VWF domain interacting with platelet GPIb, heparin and collagen and characterization of its three distinct functional sites. *J Biol Chem* 1989 ; 264 : 17361-7.
14. Fujimura Y, Titani K, Holland LZ, *et al.* A heparin-binding domain of human VWF. Characterization and localization to a tryptic fragment Val-449 to Lys-728. *J Biol Chem* 1987 ; 262 : 1734-9.
15. Parelli FI, Nilya K, McPherson JM, Ruggeri ZM. Isolation and characterization of a collagen binding domain in human VWF. *J Biol Chem* 1987 ; 262 : 13835-41.
16. Mohri Y, Fujimura Y, Shima M, *et al.* Structure of the VWF factor domain interacting with GPIb. *J Biol Chem* 1988 ; 263 : 17901-4.
17. Sugimoto M, Ricca G, Hrinda ME, *et al.* Functional modulation of isolated GPIb domain of VWF expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 1991 ; 30 : 5202-9.
18. Prior C, Chu V, Holt J, *et al.* Production and functional characterization of a recombinant fragment of VWF : an antagonist to platelet receptor GPIb. *Biotechnology* 1992, 10 : 66-73.
19. Azuma H, Dent JA, Sugimoto, Ruggeri ZM, Ware J. Independent assembly and secretion of a dimeric adhesive domain of VWF containing the GPIb binding site. *J Biol Chem* 1991, 266 : 12342-7.

T7 a été choisi en raison de ses possibilités d'application industrielle, ainsi que pour son rendement élevé en protéine exprimée.

Après optimisation des conditions de fermentation, le fragment du fvW, désigné sous le numéro de code RG 12986, a atteint une proportion de 30 % de la masse protéique globale. Cela représente un résultat au moins dix fois supérieur à celui des autres systèmes d'expression. Dans notre système, la protéine s'accumule dans le milieu intracellulaire au niveau des corpuscules d'inclusion : cela présente des avantages au niveau de la purification, étant donné qu'une étape de concentration est indispensable. En revanche, sur le plan pharmaceutique, la production industrielle se heurte aux problèmes de solubilité et de contamination bactérienne (ADN, lipopolysaccharides pyrogènes) qui doivent être contrôlés de façon rigoureuse dans le cas d'un médicament destiné à être administré par voie parentérale.

Le protocole de purification a donc été optimisé en tenant compte de ces préoccupations. Le fragment en question de 33 kDa contient sept résidus de cystéine susceptibles de former des ponts disulfures « anormaux » intra- ou intermoléculaires. En outre, la teneur en résidus d'acides aminés hydrophobes du RG 12986 représente 46 % du total. Après la rupture des bactéries par homogénéisation en présence de détergents, les corpuscules d'inclusion sont recueillis en présence d'urée (6M) et de sels (6M), après quoi on procède à une réduction et à une carboxyméthylation des groupements thiols. Une purification est ensuite réalisée par chromatographie sur échangeur d'ions Q- et CM-séparose à pH acide, suivie d'une lyophilisation.

Le milieu final de reconstitution est un tampon à pH faiblement acide contenant 5 % de mannitol comme stabilisateur. Ces conditions opératoires nous ont permis de produire en quelques mois des centaines de grammes de RG 12986 de pureté supérieure à 98 %, non pyrogène, contenant moins de 0,5 pg d'ADN par mg de protéine, ce qui répond, avec une excellente marge, aux critères requis pour des médicaments issus de la biotechnologie. L'identité de chaque lot

est confirmée par chromatographie liquide à haute pression (CLHP), détermination de la séquence terminale en acides aminés et par cartographie peptidique après protéolyse. En solution, le RG 12986 présente un rapport équilibré de monomères et de dimères, mais sans agrégats de taille plus élevée tant que le pH reste faiblement acide.

Cette dimérisation spontanée rappelle la structure du fvW naturel, dans

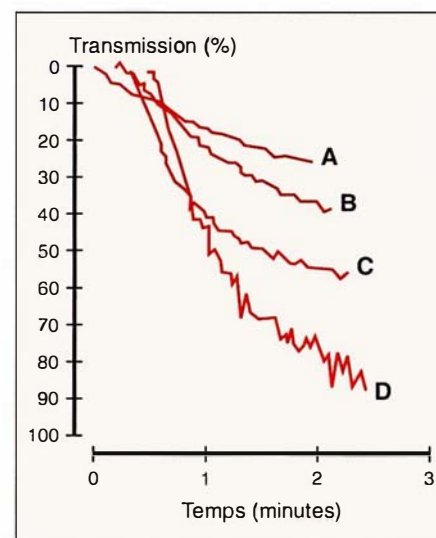


Figure 3. **Inhibition de l'agglutination plaquettaire induite par la botrocétine, par RG 12986 en présence de 6,3 µg/ml de fvW.** D : témoin, C : 2,3 µg/ml, B : 4,5 µg/ml et A : 9,3 µg/ml (concentrations croissantes de RG 12986, lot 8070.006).

lequel la région correspondant au RG 12986 participe à la formation d'homodimères. Il est intéressant de noter que, lorsque la séquence du RG 12986 est exprimée dans un système de cellules de mammifères telles que les cellules d'ovaires de hamsters chinois (CHO), la protéine est sécrétée sous forme de monomères et de dimères en équilibre, cet équilibre persistant tant que les ponts disulfures sont bloqués [19]. La stabilité physique et biologique du produit est supérieure à trois mois à +

4 °C et persiste plusieurs heures à la température ambiante, après reconstitution.

Activité du fragment du fvW

Le fragment recombinant du fvW, RG 12986, se lie de façon réversible aux plaquettes humaines non activées, avec une affinité variant de 10 à 50 nM⁻¹ selon le type de tampon utilisé. Ces résultats ont été obtenus soit par mesure de sa liaison directe, soit par mesure de l'inhibition de la liaison du fvW naturel ou de celle d'anticorps monoclonaux dirigés contre le GP Ib. L'analyse des courbes de liaison spécifique indique que l'inhibition est de type compétitif. Contrairement au fvW naturel, le RG 12986 interagit directement avec la GP Ib en l'absence de modulateurs exogènes tels que la ristocétine ou la botrocétine. Cela pourrait être dû au fait que le RG 12986 n'est pas glycosylé et qu'il présenterait ainsi une conformation apte à sa liaison directe, à la différence du fvW naturel.

Le RG 12986 inhibe l'adhérence plaquettaire à des surfaces recouvertes soit de collagène, soit d'une matrice cellulaire endothéliale, soumises à un flux de sang total. Il inhibe également l'agglutination plaquettaire induite par la ristocétine et la botrocétine. Dans ces systèmes, la concentration inhibitrice 50 % du RG 12986 varie de 0,2 à 1 µM (figure 3). Ces concentrations efficaces relativement élevées reflètent sans doute la nécessité de bloquer la majeure partie des récepteurs GP Ib-IX pour pouvoir empêcher tout début d'agglutination plaquettaire. Nous avons étudié l'efficacité *in vivo* du RG 12986 dans deux modèles de thrombose artérielle, chez le porc et chez le singe, deux espèces animales dont les plaquettes présentent une réactivité croisée avec le RG 12986. Nous avons adapté le modèle de Folts (réduction cyclique du flux sanguin par sténose artérielle partielle), décrit initialement chez le chien, à l'artère carotide du porc. Le RG 12986 s'est avéré actif à des doses variant de 0,05 à 5 mg/kg par voie intraveineuse avec une diminution de la fréquence d'accumulation des plaquettes pour les faibles doses

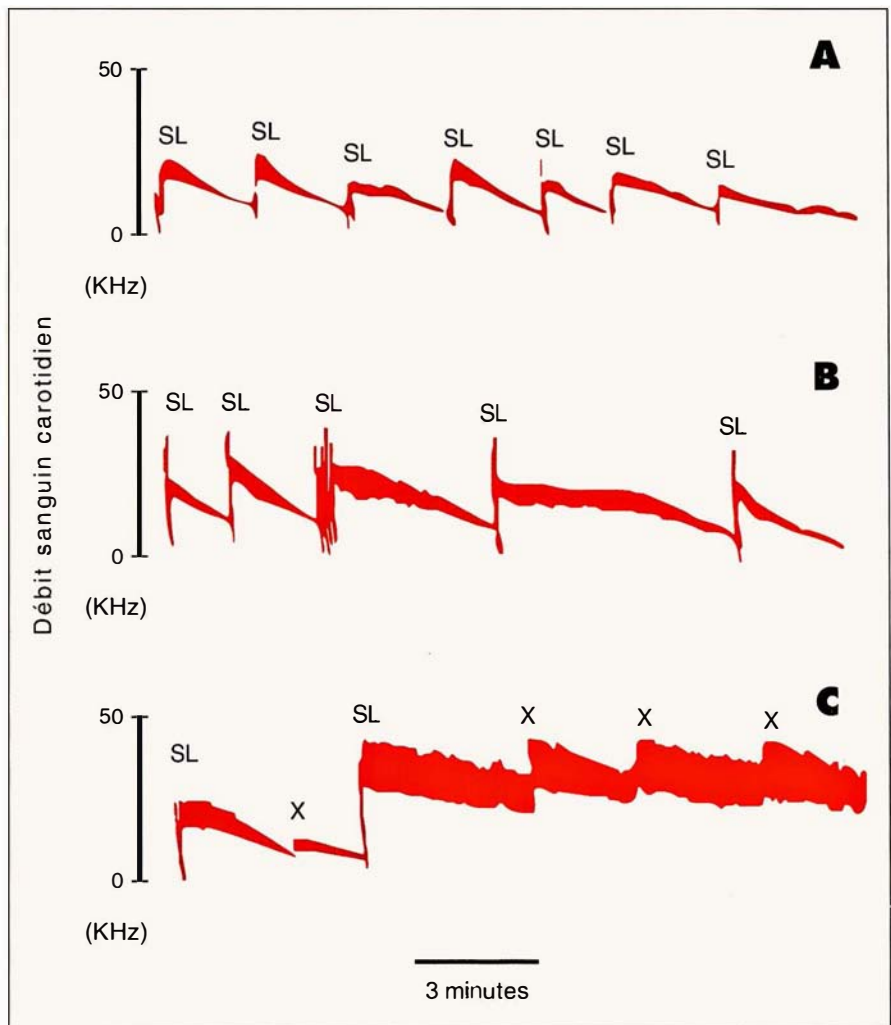


Figure 4. **Effets du RG 12986 et du solvant (milieu salin tamponné) sur les variations cycliques, dépendantes des plaquettes, du débit artériel carotidien chez le porc.** Aucun effet n'est observé durant la perfusion du solvant (figure 4A). RG 12986 produit deux effets caractéristiques. La figure 4B montre l'allongement du temps d'occlusion vasculaire (2,5 fois dans cet exemple) par rapport à sa durée moyenne avant perfusion du produit. La figure 4C montre la suppression totale des phases cycliques du débit artériel ; alors que le débit diminue, les amas plaquettaires se détachent (X).

et une abolition totale de la thrombogénèse à partir de 1 mg/kg (figure 4). L'administration du fragment n'a entraîné aucune modification du nombre des plaquettes, de l'hématocrite et du taux de fvW circulant. Chez le singe, nous avons utilisé un modèle de thrombose induite par un courant anodal après sténose de l'artère carotide. Le RG 12986 est actif dans ce modèle à des doses comprises entre 1 et 5 mg/kg en prolongeant de façon significative la durée

de maintien d'un débit circulatoire normal. La seule modification hématologique observée a été une légère thrombocytémie transitoire.

Dans ces deux modèles expérimentaux, l'aggrégation plaquettaire induite, *ex vivo*, par la botrocétine s'est trouvée modifiée parallèlement à l'effet antithrombotique. La demi-vie physique et biologique du RG 12986, après une injection unique, est d'environ 1 heure, avec une élimination quasi quantitative par l'urine.

Perspectives

Des études de tolérance et de sécurité du médicament ont été réalisées chez le singe par perfusions répétées du RG 12986 durant 21 jours, à des doses variant de 1 à 100 mg/kg. Tous les animaux ont présenté des anticorps dirigés contre le RG 12986 en fin d'étude, néanmoins aucun signe de toxicité n'a été observé.

Munis de ces données et encouragés par les activités *in vitro* et *in vivo* du fragment, nous avons constitué, en 1991, un dossier de soumission du RG 12986 afin d'entreprendre des études cliniques aux États-Unis (IND). Les études de pharmacologie clinique chez le volontaire sain sont actuellement en cours. Nous avons retenu un grand nombre d'indications thérapeutiques potentielles allant de la démonstration du mécanisme d'action chez des patients, rares, atteints de purpura thrombotique thrombocytopénique, à l'essai de prévention de la re-sténose post-thrombolytique dans des cas de thrombose coronarienne. Une première indication thérapeutique sera vraisemblablement le traitement des complications thrombotiques survenant après angioplastie chez un certain nombre de patients, en raison de la brève durée d'évaluation et de l'accessibilité de ces malades en milieu hospitalier.

Les défis que représente le développement clinique de notre fragment recombinant sont liés à sa brève demi-vie et au risque potentiel d'immunogénicité qu'il présente malgré sa séquence humaine. La courte durée de vie du RG 12986 risque de limiter son utilisation à des situations aiguës. Quant à l'immunogénicité, celle-ci serait tolérable pour autant qu'il n'apparaisse pas d'anticorps neutralisant l'activité thérapeutique ou provoquant des réactions allergiques.

Il n'en reste pas moins que, malgré la prudence requise pour tout développement pharmaceutique innovateur, nous abordons ce projet avec un grand enthousiasme, comme la concrétisation d'une hypothèse de travail fondée sur la connaissance précise d'un mécanisme d'action et rendue possible grâce aux progrès des techniques du génie génétique ■

Summary

Recombinant VWF fragment, a new arterial antithrombotic agent

Advances in the understanding of the mechanisms at play in arterial thrombus formation at the level of platelet receptors and their ligands prompted us to target the von Willebrand factor — GPIb interaction. Based on the identification of the binding domains of human von Willebrand factor to its platelet receptors, we expressed a recombinant peptide fragment containing the structural elements necessary to interact with GPIb. High level expression was achieved in a plasmid construct driven by the bacteriophage T7 promoter. A purification process was designed at large scale to obtain a stable, soluble product (RG 12986) of clinical parenteral quality. RG 12986 behaves as a competitive inhibitor of intact von Willebrand factor *in vitro* for induction of platelet adhesion and aggregation. RG 12986 also proved effective in preventing thrombus formation *in vivo* in models of coronary thrombogenesis in the pig and the monkey without untoward effects. Initial clinical investigations are underway for this novel antithrombotic agent made possible by genetic engineering techniques.

TIRÉS A PART

A. Uzan.