

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

3 003331 00

PETITORIO

Radicación : 03003331 00000000

Fecha (MM): 2003-01-20 17:21:30

Folios: 61 in

Tramite : 011 PCT-PATENT 773 FASE NACI
Dependencia: 2020 FIVIS:LA DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE **PCT** **ENTRADA EN FASE NACIONAL**

1**SOLICITUD DE:**

Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2**SOLICITANTE**
(71)Nombre: **AVENTIS PHARMA S.A.**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Francia.Dirección: 20 Avenue Raymond Aron,
F-92160 Antony,
Francia.

Domicilio: Antony, Francia.

IDENTIFICACION

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual _____

Número: _____

3**REPRESENTANTE**
O APODERADONombre: **EMILIO FERRERO**

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax:: 217 92 11

E-mail: clientes@camyo.com.

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACION

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual _____

Número: 438.019 T.P. 31.929**4****INVENTOR (ES)**
(72)1- Jacques DIAZ
24 bis rue des Parolaires,
F-94170 Le Perreux-sur-Marne,
Francia.3- Elisabeth PERRIN
23 rue Poltevin,
F-27000 Evreux,
Francia.2- Christelle PECQUET
18 rue Lavoisier
F- 93130 Nolas Le Sec
Francia.4- Christian VISKOV
3 rue du Béarn
F-91130 Ris Orange,
Francia.**5****PCT (66)**Solicitud Internacional No. PCT/FR01/02332Publicación Internacional No. WO 02/08295 A1Fecha: 18 de julio de 2001Fecha : 31 de enero de 2002**6****Título (54)** MEZCLAS DE POLISACARIDOS DERIVADOS DE HEPARINA. SU PREPARACION
Y LAS COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE LOS CONTIENEN**7****Clasificación Internacional (51)** C08B 37/10, A61K 31/727**8****Prioridad**SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

FR.

(32) Fecha

21 de julio de 2000

(31) Número de Solicitud

00/09572

9

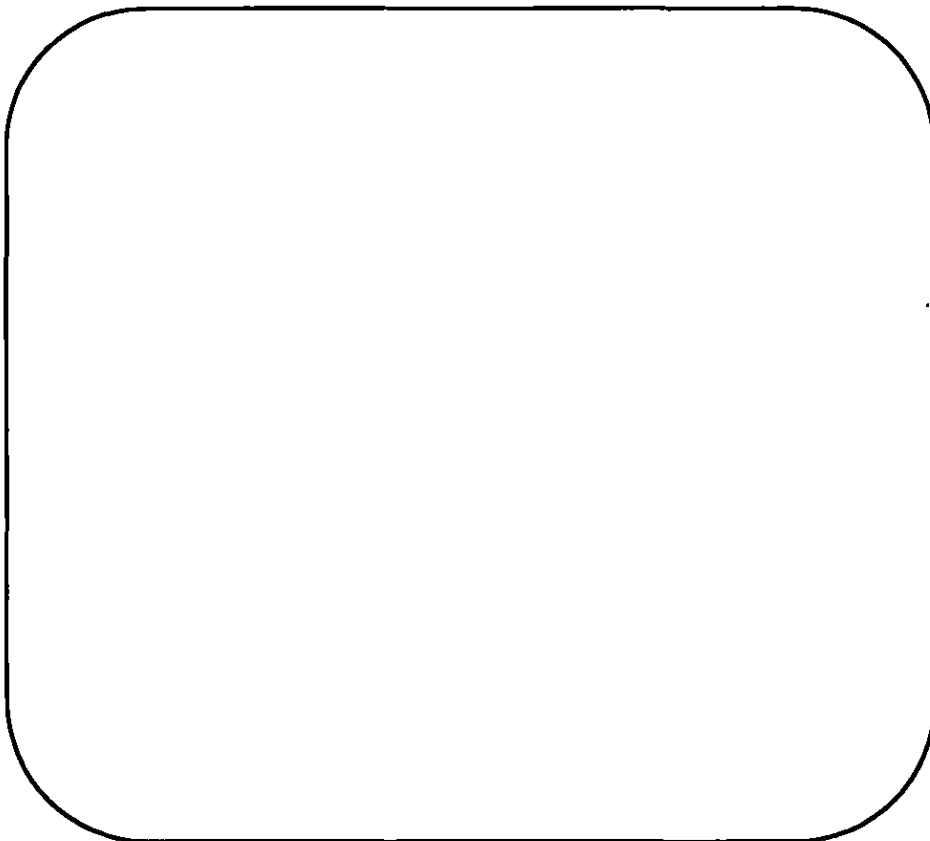
Comprobantes de pago No.: 02-82.552 y 03-2.455 Fecha: 9 de Dic/02 y 14 de enero de 2003

10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 400.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ Otros

11

FIGURA CARACTERISTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA : 
C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

 MRE/mrm-Id-64-

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
31 janvier 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/08295 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

C08B 37/10, A61K 31/727

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR01/02332

(22) Date de dépôt international : 18 juillet 2001 (18.07.2001)*

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

00/09572

21 juillet 2000 (21.07.2000) FR

(71) Déposant : AVENTIS PHARMA S.A. (FR/FR); 20 Avenue Raymond Aron, F-92160 ANTONY (FR).

(72) Inventeurs : DIAZ, Jacques; 24 bis rue des Parcelairs, F-94170 LE PIREUX-SUR-MARNE (FR). PECQUET, Christelle; 18 rue Lavoisier, F-93130 NOISY LE SEC (FR). PERRIN, Elisabeth; 23 rue Poitevin, F-27000 EVREUX (FR). VISKOV, Christian; 3 rue du Hémart, F-91130 RIS ORANGIS (FR).

(74) Mandataire : ROUSSEAU, Pierrick; AVENTIS PHARMA S.A., Direction Brevets, 20 Avenue Raymond Aron, F-92160 ANTONY CEDEX (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

WO 02/08295 A1

(54) Title: HEPARIN-DERIVED POLYSACCHARIDE MIXTURES, PREPARATION METHOD AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING SAME

(54) Titre : MÉLANGES DE POLYSACCHARIDES DÉRIVÉS D'HEPARINE, LEUR PRÉPARATION ET LES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT

(57) Abstract: The invention concerns heparin-derived polysaccharide mixtures, their preparation method and pharmaceutical compositions containing them

(57) Abrégé : La présente invention concerne des mélanges de polysaccharides dérivés d'héparine, leur procédé de préparation et les compositions pharmaceutiques les contenant.

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

5
(A)

Expéditeur: L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE
LA RECHERCHE INTERNATIONALE

PCT

Destinataire
AVENTIS PHARMA S.A.
Direction Brevets
A l'att. de ROUSSEAU, Pierre
20 avenue Raymond Aron
F-92165 Antony Cedex
FRANCE

DIRECTION BREVETS
10 DEC. 2001
PATENT DEPARTMENT

NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU
RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
OU DE LA DECLARATION

(règle 44.1 du PCT)

10/06/02/01

Référence du dossier du déposant ou du mandataire ST00022	POUR SUITE A DONNER voir les paragraphes 1 et 4 ci-après
Demande internationale n° PCT/FR 01/ 02332	Date du dépôt international (jour/mois/année) 18/07/2001
Déposant AVENTIS PHARMA S.A.	

1. ☒ Il est notifié au déposant que le rapport de recherche internationale a été établi et lui est transmis ci-joint.
Dépôt de modifications et d'une déclaration selon l'article 19 :
Le déposant peut, s'il le souhaite, modifier les revendications de la demande internationale (voir la règle 46):

Quand? Le délai dans lequel les modifications doivent être déposées est de deux mois à compter de la date de transmission du rapport de recherche internationale ; pour plus de précisions, voir cependant les notes figurant sur la feuille d'accompagnement.

Où? Directement auprès du Bureau International de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse
n° de télécopieur: (41-22)740.14.35

Pour des instructions plus détaillées, voir les notes sur la feuille d'accompagnement.

2. ☐ Il est notifié au déposant qu'il ne sera pas établi de rapport de recherche internationale et la déclaration à cet effet, prévue à l'article 17.2a), est transmise ci-joint.

3. ☐ En ce qui concerne la réserve pouvant être formulée, conformément à la règle 40.2, à l'égard du paiement d'une ou de plusieurs taxes additionnelles, il est notifié au déposant que

☐ la réserve ainsi que la décision y relative ont été transmises au Bureau International en même temps que la requête du déposant tendant à ce que le texte de la réserve et celui de la décision en question soient notifiés aux offices désignés.

☐ la réserve n'a encore fait l'objet d'aucune décision; dès qu'une décision aura été prise, le déposant en sera avisé.

4. Mesure(s) consécutive(s) : Il est rappelé au déposant ce qui suit:

Peu après l'expiration d'un délai de 18 mois à compter de la date de priorité, la demande internationale sera publiée par le Bureau International. Si le déposant souhaite éviter ou différer la publication, il doit faire parvenir au Bureau international une déclaration de retrait de la demande internationale, ou de la revendication de priorité, conformément aux règles 90bis.1 et 90bis.3, respectivement, avant l'achèvement de la préparation technique de la publication internationale.

Dans un délai de 19 mois à compter de la date de priorité, le déposant doit présenter la demande d'examen préliminaire international s'il souhaite que l'ouverture de la phase nationale soit reportée à 30 mois à compter de la date de priorité (ou même au-delà dans certains offices).

Dans un délai de 20 mois à compter de la date de priorité, le déposant doit accomplir les démarches prescrites pour l'ouverture de la phase nationale auprès de tous les offices désignés qui n'ont pas été élus dans la demande d'examen préliminaire international ou dans une election ultérieure avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou qui ne pouvaient pas être élus parce qu'ils ne sont pas liés par le chapitre II.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Alfredo Prein

15

P1

NOTES RELATIVES AU FORMULAIRE PCT/ISA/220

Les présentes notes sont destinées à donner les instructions essentielles concernant le dépôt de modifications selon l'article 19. Les notes sont fondées sur les exigences du Traité de coopération en matière de brevets (PCT), du règlement d'exécution et des instructions administratives du PCT. En cas de divergence entre les présentes notes et ces exigences, ce sont ces dernières qui priment. Pour de plus amples renseignements, on peut aussi consulter le Guide du déposant du PCT, qui est une publication de l'OMPI.

Dans les présentes notes, les termes "article", "règle" et "instruction" renvoient aux dispositions du traité, de son règlement d'exécution et des instructions administratives du PCT, respectivement.

INSTRUCTIONS CONCERNANT LES MODIFICATIONS SELON L'ARTICLE 19

Après réception du rapport de recherche internationale, le déposant a la possibilité de modifier une fois les revendications de la demande internationale. On notera cependant que, comme toutes les parties de la demande internationale (revendications, description et dessins) peuvent être modifiées au cours de la procédure d'examen préliminaire international, il n'est généralement pas nécessaire de déposer de modifications des revendications selon l'article 19 sauf, par exemple, au cas où le déposant souhaite que ces dernières soient publiées aux fins d'une protection provisoire ou à une autre raison de modifier les revendications avant la publication internationale. En outre, il convient de rappeler que l'obtention d'une protection provisoire n'est possible que dans certains Etats.

Quelles parties de la demande internationale peuvent être modifiées?

Selon l'article 19, les revendications exclusivement.

Durant la phase internationale, les revendications peuvent aussi être modifiées (ou modifiées à nouveau) selon l'article 34 auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international. La description et les dessins ne peuvent être modifiées que selon l'article 34 auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international.

Lors de l'ouverture de la phase nationale, toutes les parties de la demande internationale peuvent être modifiées selon l'article 28 ou, le cas échéant, selon l'article 41.

Quand?

Dans un délai de deux mois à compter de la date de transmission du rapport de recherche internationale ou de 16 mois à compter de la date de priorité, selon l'échéance la plus tardive. Il convient cependant de noter que les modifications seront réputées avoir été reçues en temps voulu si elles parviennent au Bureau international après l'expiration du délai applicable mais avant l'achèvement de la préparation technique de la publication internationale (règle 46.1).

Où ne pas déposer les modifications?

Les modifications ne peuvent être déposées qu'auprès du Bureau international; elles ne peuvent être déposées ni auprès de l'office récepteur ni auprès de l'administration chargée de la recherche internationale (règle 46.2).

Lorsqu'une demande d'examen préliminaire international a été/est déposée, voir plus loin.

Comment?

Soit en supprimant entièrement une ou plusieurs revendications, soit en ajoutant une ou plusieurs revendications nouvelles ou encore en modifiant le texte d'une ou de plusieurs des revendications telles que déposées.

Une feuille de remplacement doit être remise pour chaque feuille des revendications qui, en raison d'une ou de plusieurs modifications, diffère de la feuille initialement déposée.

Toutes les revendications figurant sur une feuille de remplacement doivent être numérotées en chiffres arabes. Si une revendication est supprimée, il n'est pas obligatoire de renuméroter les autres revendications. Chaque fois que des revendications sont renumérotées, elles doivent l'être de façon continue (instruction 205.b)).

Les modifications doivent être effectuées dans la langue dans laquelle la demande internationale est publiée.

Quels documents doivent/puvent accompagner les modifications?

Lettre (instruction 205.b)):

Les modifications doivent être accompagnées d'une lettre.

La lettre ne sera pas publiée avec la demande internationale et les revendications modifiées. Elle ne doit pas être confondue avec la "déclaration selon l'article 19.1)" (voir plus loin sous "Déclaration selon l'article 19.1)").

La lettre doit être rédigée en anglais ou en français, au choix du déposant. Cependant, si la langue de la demande internationale est l'anglais, la lettre doit être rédigée en anglais; si la langue de la demande internationale est le français, la lettre doit être rédigée en français.

La lettre doit indiquer les différences existant entre les revendications telles que déposées et les revendications telles que modifiées. Elle doit indiquer en particulier, pour chaque revendication figurant dans la demande internationale (étant entendu que des indications identiques concernant plusieurs revendications peuvent être groupées), si

- i) la revendication n'est pas modifiée;
- ii) la revendication est supprimée;
- iii) la revendication est nouvelle;
- iv) la revendication remplace une ou plusieurs revendications telles que déposées;
- v) la revendication est le résultat de la division d'une revendication telle que déposée.

Les exemples suivants illustrent la manière dont les modifications doivent être expliquées dans la lettre d'accompagnement:

1. [Lorsque le nombre des revendications déposées initialement s'élevait à 48 et qu'à la suite d'une modification de certaines revendications il s'élève à 51]:
"Revendications 1 à 15 remplacées par les revendications modifiées portant les mêmes numéros; revendications 30, 33 et 36 pas modifiées; nouvelles revendications 49 à 51 ajoutées."
2. [Lorsque le nombre des revendications déposées initialement s'élevait à 15 et qu'à la suite d'une modification de toutes les revendications il s'élève à 11]:
"Revendications 1 à 15 remplacées par les revendications modifiées 1 à 11."
3. [Lorsque le nombre des revendications déposées initialement s'élevait à 14 et que les modifications consistent à supprimer certaines revendications et à en ajouter de nouvelles]:
"Revendications 1 à 5 et 14 pas modifiées; revendications 7 à 13 supprimées; nouvelles revendications 15, 16 et 17 ajoutées." ou
"Revendications 7 à 13 supprimées; nouvelles revendications 15, 16 et 17 ajoutées; toutes les autres revendications pas modifiées."
4. [Lorsque plusieurs sortes de modifications sont faites]:
"Revendications 1-10 pas modifiées; revendications 11 à 13, 18 et 19 supprimées; revendications 14, 15 et 16 remplacées par la revendication modifiée 14; revendication 17 divisée en revendications modifiées 15, 16 et 17; nouvelles revendications 20 et 21 ajoutées."

"Déclaration selon l'article 19.1)" (Règle 46.4)

Les modifications peuvent être accompagnées d'une déclaration expliquant les modifications et précisant l'incidence que ces dernières peuvent avoir sur la description et sur les dessins (qui ne peuvent pas être modifiés selon l'article 19.1)).

La déclaration sera publiée avec la demande internationale et les revendications modifiées.

Elle doit être rédigée dans la langue dans laquelle la demande internationale est publiée.

Elle doit être succincte (ne pas dépasser 500 mots si elle est établie ou traduite en anglais).

Elle ne doit pas être confondue avec la lettre expliquant les différences existant entre les revendications telles que déposées et les revendications telles que modifiées, et ne la remplace pas. Elle doit figurer sur une feuille distincte et doit être munie d'un titre permettant de l'identifier comme telle, constitué de préférence des mots "Déclaration selon l'article 19.1)".

Elle ne doit contenir aucun commentaire dénigrant relatif au rapport de recherche internationale ou à la pertinence des citations que ce dernier contient. Elle ne peut se référer à des citations se rapportant à une revendication donnée et contenues dans le rapport de recherche internationale qu'en relation avec une modification de cette revendication.

Conséquences du fait qu'une demande d'examen préliminaire international ait déjà été présentée

Si, au moment du dépôt de modifications effectuées en vertu de l'article 19, une demande d'examen préliminaire international a déjà été présentée, le déposant doit de préférence, lors du dépôt des modifications auprès du Bureau international, déposer également une copie de ces modifications auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 62.2a), première phrase).

Conséquence au regard de la traduction de la demande internationale lors de l'ouverture de la phase nationale

L'attention du déposant est appelée sur le fait qu'il peut avoir à remettre aux offices désignés ou élus, lors de l'ouverture de la phase nationale, une traduction des revendications telles que modifiées en vertu de l'article 19 au lieu de la traduction des revendications telles que déposées ou en plus de celle-ci.

Pour plus de précisions sur les exigences de chaque office désigné ou élu, voir le volume II du Guide du déposant du PCT.

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire ST00022	POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER	
Demande internationale n° PCT/FR 01/ 02332	Date du dépôt international (jour/mois/année) 18/07/2001	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 21/07/2000
Déposant AVENTIS PHARMA S.A.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 03 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la langue, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale (le cas échéant la recherche internationale a été effectuée sur la base du listing des séquences :

☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ La déclaration, selon laquelle le listing des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listing des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'abrégé,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°

☐ suggérée par le déposant.

☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☐ Aucune des figures n'est à publier.

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C08B37/10 A61K31/727		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C08B		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 027 089 A (CHOAY S.A.) 15 avril 1981 (1981-04-15) abrégé page 1, ligne 9 - ligne 20 page 2, ligne 14 - page 3, ligne 10 page 3, ligne 25 - ligne 32 page 4, ligne 23 - page 5, ligne 18 page 9, ligne 8 - ligne 10 page 10 page 11, ligne 21 - ligne 29 page 22, ligne 15 - ligne 20 revendications 1-10 --- -/--	1, 4-6, 20
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non consacré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 16 novembre 2001		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 06/12/2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Mazet, J-F

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 040 144 A (PHARMINDUSTRIE) 18 novembre 1981 (1981-11-18) cité dans la demande abrégé page 4, ligne 20 - ligne 34 page 5; tableau A page 7, ligne 20 - ligne 28 page 8, ligne 10 - ligne 24 page 11, ligne 10 - ligne 14 exemples 7,8 tableau 8 revendications 1,5	1,4,7,8, 13-16,20
A	DATABASE CHEMABS 'en ligne! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; VILA PAHI, F. JAVIER ET AL: "Preparation of saccharide oligomers by chemical depolymerization of heparin derivatives" retrieved from STN Database accession no. 125:303695 CA XP002165129 abrégé & ES 2 077 533 A (BIOIBERICA, S.A., SPAIN) 16 novembre 1995 (1995-11-16)	
A	WO 81 02737 A (CHOAY S.A.) 1 octobre 1981 (1981-10-01)	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 01/02332

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets(s)	Date de publication
EP 27089	A	15-04-1981	AT 17586 T	15-02-1986
			AU 543679 B2	26-04-1985
			AU 6392080 A	28-04-1981
			CA 1194441 A1	01-10-1985
			DE 3071370 D1	06-03-1986
			DK 247981 A	04-06-1981
			EP 0027089 A1	15-04-1981
			WO 8101004 A1	16-04-1981
			IE 51166 B1	29-10-1986
			IL 61201 A	30-09-1984
			JP 2031721 B	16-07-1990
			JP 56501320 T	17-09-1981
			US 4401758 A	30-08-1983
			US 4401662 A	30-08-1983
			US 4474770 A	02-10-1984
			US RE35770 E	14-04-1998
			US 4826827 A	02-05-1989
			ES 495658 D0	01-10-1981
			ES 8107245 A1	16-12-1981
EP 40144	A	18-11-1981	FR 2482611 A1	20-11-1981
			AR 229510 A1	15-09-1983
			AT 384428 B	10-11-1987
			AT 213681 A	15-04-1987
			AU 535791 B2	05-04-1984
			AU 7051981 A	19-11-1981
			CA 1181744 A1	29-01-1985
			DE 3165361 D1	13-09-1984
			DK 211981 A	15-11-1981
			EP 0040144 A1	18-11-1981
			ES 502199 D0	16-08-1982
			ES 8206555 A1	16-11-1982
			FI 811469 A ,B,	15-11-1981
			GR 82283 A1	13-12-1984
			HU 34769 A2	28-04-1985
			IE 51283 B1	26-11-1986
			IL 62866 A	29-06-1984
			IN 152828 A1	14-04-1984
			JP 1324284 C	27-06-1986
			JP 57010601 A	20-01-1982
			JP 60051482 B	14-11-1985
			KR 8401753 B1	19-10-1984
			MX 6537 E	04-07-1985
			NO 811632 A ,B,	16-11-1981
			NZ 197081 A	31-07-1984
			PT 73024 A ,B	01-06-1981
			ZA 8103176 A	26-05-1982
ES 2077533	A	16-11-1995	ES 2077533 A1	16-11-1995
WO 8102737	A	01-10-1981	FR 2478646 A2	25-09-1981
			AR 227417 A1	29-10-1982
			AT 26450 T	15-04-1987
			AU 540433 B2	15-11-1984
			AU 6787081 A	09-10-1981
			BA 97179 B1	28-12-1998
			CA 1207759 A1	15-07-1986
			CS 222245 B2	27-05-1983

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

12
Demande internationale No

PCT/FR 01/02332

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 8102737 A		DD 157561 A5	17-11-1982
		DE 3176086 D1	14-05-1987
		DK 511381 A	18-11-1981
		EP 0037319 A1	07-10-1981
		ES 501130 D0	16-01-1982
		ES 8201596 A1	16-03-1982
		WO 8102737 A1	01-10-1981
		HR 970502 B1	30-04-1998
		HU 188657 B	28-05-1986
		IE 52951 B1	27-04-1988
		IL 62424 A	31-12-1984
		JP 2031081 B	11-07-1990
		JP 57500335 T	25-02-1982
		PL 230237 A1	13-11-1981
		SI 8110736 A8	30-06-1997
		SU 1658820 A3	23-06-1991
		US 4500519 A	19-02-1985
		US 4686288 A	11-08-1987
		YU 73681 A1	31-10-1983

MELANGES DE POLYSACCHARIDES DERIVES D'HEPARINE. LEUR
PREPARATION ET LES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES
CONTENANT

La présente invention concerne des mélanges de polysaccharides dérivés d'héparine,
5 leur procédé de préparation et les compositions pharmaceutiques les contenant.

L'héparine est un mélange de mucopolysaccharides sulfatés d'origine animale, utilisée
notamment pour ses propriétés anticoagulantes et antithrombotiques.

L'héparine présente cependant des inconvénients qui limitent les conditions de son
utilisation. En particulier, son activité anticoagulante (activité anti-IIa) importante
10 peut occasionner des hémorragies.

Des héparines de bas poids moléculaire obtenues par dépolymérisation basique
d'esters d'héparine ont été proposées (EP40144); cependant ces produits ont encore
une activité anti-IIa importante.

L'invention est relative à des mélanges de polysaccharides dérivés d'héparine
15 possédant une activité plus sélective vis-à-vis du facteur X activé (facteur Xa) et du
facteur II activé (facteur IIa) que l'héparine.

La présente invention a plus particulièrement pour objet les mélanges de
polysaccharides sulfatés possédant la structure générale des polysaccharides
constitutifs de l'héparine et présentant les caractéristiques suivantes :

20 - ils ont un poids moléculaire moyen de 1500 à 3000 daltons, une activité anti-Xa de
100 à 150 UI/mg, une activité anti-IIa de 0 à 10 UI/mg et un rapport activité anti-
Xa/activité anti-IIa supérieur à 10,

- les polysaccharides constitutifs des mélanges contiennent 2 à 26 motifs
saccharidiques et ont un motif acide glucuronique-4,5 insaturé 2-O-sulfate à l'une de
25 leurs extrémités,

sous forme d'un sel de métal alcalin ou alcalinoterreux.

Comme sel de métal alcalin ou alcalinoterreux, sont préférés les sels de sodium,
potassium, calcium et magnésium.

Le poids moléculaire moyen est déterminé par chromatographie liquide haute pression en utilisant deux colonnes en série par exemple celles commercialisées sous le nom de TSK G3000 XL et TSK G2000 XL. La détection est réalisée par réfractométrie. L'éluant utilisé est du nitrate de lithium et le débit est de 0,6 ml/min.

- 5 Le système est calibré avec des standards préparés par fractionnement de l'enoxaparine (AVENTIS) par chromatographie sur gel d'agarose-polyacrylamide (IBF). Cette préparation est réalisée selon la technique décrite par Barrowcliffe et coll., *Thromb. Res.*, 12, 27-36 (1977-78) ou D.A. Lane et coll., *Thromb. Res.*, 12, 257-271 (1977-78). Les résultats sont calculés à l'aide du logiciel GPC6 (Perkin
10 Elmer).

L'activité anti-Xa est mesurée par la méthode amidolytique sur un substrat chromogénique décrite par Teien et coll., *Thromb. Res.*, 10, 399-410 (1977), avec comme étalon le premier étalon international des héparines de bas poids moléculaire.

- L'activité anti-IIa est mesurée par la technique décrite par Anderson L.O. et coll.,
15 *Thromb. Res.*, 15, 531-541 (1979), avec comme étalon le premier étalon international des héparines de bas poids moléculaire.

De préférence, les mélanges tels que décrits plus haut présentent une activité anti Xa comprise entre 125 et 150 UI/mg.

- Tout particulièrement les mélanges tels que décrits plus haut présentent une activité
20 anti Xa comprise entre 140 et 150 UI/mg et ont un poids moléculaire moyen compris entre 2000 et 3000 dalton

De préférence, les mélanges selon l'invention ont une activité anti-IIa de 0 à 5 UI/mg.

Encore plus préférentiellement, les mélanges présentent un rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa supérieur à 25.

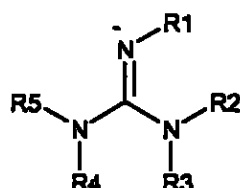
- 25 Les mélanges d'oligosaccharides selon l'invention peuvent être préparés par dépolymérisation d'un sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine en milieu organique, au moyen d'une base organique forte de pKa supérieur à 20 ou d'imidazolate de sodium, transformation du sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine dépolymérisée en sel de sodium, saponification de l'ester et
30 éventuellement purification.

Le sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine est de préférence le sel de benzéthonium, de cétypyridinium ou de cétyltriméthylammonium.

- La dépolymérisation s'effectue généralement au sein d'un solvant organique inerte tel qu'un solvant chloré (dichlorométhane par exemple), le tétrahydrofurane, l'anisole, à une température de -20°C à 40°C.

Comme base organique forte de pka supérieur à 20, on peut utiliser le 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ène, la 2-tert-butylimino-2-diéthylamino-1,3-diméthylperhydro-1,3,2-diazaphosphorine, les bases de la famille de la guanidine et des phosphazènes.

- 10 Les bases de la famille des guanidines sont de préférence celles de formule :

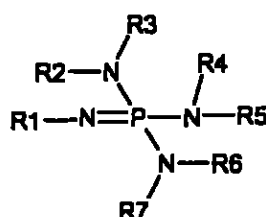


dans laquelle R₁ est hydrogène ou alkyle, R₂, R₃, R₄ et R₅ identiques ou différents représentent chacun un radical alkyle.

Plus particulièrement, R₁ est hydrogène et R₂, R₃, R₄ et R₅ sont des radicaux méthyle.

- 15 Les bases organiques fortes apparentées à la famille des phosphazènes sont définies par exemple selon R. Schwesinger et coll., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 26, 1167-1169 (1987), R. Schwesinger et coll., Angew. Chem. 105, 1420 (1993).

Parmi les bases de la famille des phosphazènes on utilise, de préférence, celles de formule :



20

dans laquelle les radicaux R₁ à R₇ sont identiques ou différents et représentent des radicaux alkyle.

Dans les formules précédentes, les radicaux alkyle contiennent 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée.

- Avantageusement, le rapport en mole base organique forte de pka supérieur à 20 ou imidazolate de sodium/sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine est compris entre 0,2 et 5 et, de préférence, entre 1 et 4.

Plus particulièrement, le taux d'estérification du sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine est compris entre 50 et 100% et, de préférence, entre 70 et 90%. Ce taux d'estérification correspond au pourcentage molaire d'estérification des acides uroniques de l'héparine.

- 10 La transformation du sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine dépolymérisée en sel de sodium est effectuée, généralement, par traitement du milieu réactionnel avec une solution alcoolique d'acétate de sodium et, de préférence, avec une solution à 10% d'acétate de sodium dans le méthanol (poids/volume), à une température comprise entre 15 et 25°C. L'équivalent en poids d'acétate ajouté est
15 préférentiellement 3 fois supérieur à la masse de sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine engagé dans la réaction de dépolymérisation.

- La saponification s'effectue généralement au moyen d'un hydroxyde de métal alcalin tel que la soude, la potasse, l'hydroxyde de lithium, en milieu aqueux, à une température comprise entre 0 et 20°C et, de préférence, entre 0 et 10°C. On utilisera de
20 façon générale de 1 à 5 équivalents molaires d'hydroxyde de métal alcalin. De préférence, la saponification sera réalisée en présence de 2 à 3 équivalents molaires d'hydroxyde de métal alcalin.

- Le produit final peut éventuellement être purifié par toute méthode connue de purification des héparines dépolymérisées et notamment selon la méthode décrite
25 dans le brevet EP 0037319. De préférence, on purifie au moyen de peroxyde d'hydrogène, en milieu aqueux, à une température de 10 à 50°C. De préférence, cette opération sera réalisée entre 20 et 40°C.

Le sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine peut être préparé selon le schéma réactionnel suivant :

- 30 a) transformation de l'héparine sous forme de sel de sodium au moyen du chlorure de benzéthonium pour obtenir l'héparinate de benzéthonium,

b) estérification du sel de benzéthonium obtenu précédemment au moyen du chlorure de benzyle et traitement par une solution alcoolique d'acétate de sodium pour obtenir le sel de sodium de l'ester benzylique de l'héparine,

5 c) transalification du sel de sodium de l'ester benzylique de l'héparine en sel d'ammonium quaternaire et, de préférence en sel de benzéthonium, de cétylpyridinium ou de cétyltriméthylammonium,

La réaction de l'étape a) est réalisée en milieu aqueux, par action du chlorure de benzéthonium en excès, sur l'héparine sous forme de sel de sodium, à une température voisine de 15 à 25°C. De manière avantageuse, le rapport molaire chlorure de
10 benzéthonium/héparine sous forme de sel de sodium est compris entre 2 et 3 et plus particulièrement 2,5.

L'héparine sous forme de sel de sodium de départ utilisée est de préférence une héparine de porc. Celle-ci peut être préalablement purifiée pour diminuer son taux de dermatane sulfate selon le procédé décrit dans le brevet FR2663639.

15 L'estérification de l'étape b) s'effectue de préférence au sein d'un solvant organique chloré (chloroforme, chlorure de méthylène par exemple), à une température comprise entre 25 et 45°C et, de préférence entre 30 et 40°C. L'ester sous forme de sel de sodium est ensuite récupéré par précipitation au moyen d'acétate de sodium à 10% en poids/volume dans un alcool tel que le méthanol. On emploie généralement 1 à 1,2
20 volume d'alcool par volume de milieu réactionnel. La quantité de chlorure de benzyle et le temps de réaction sont adaptés pour obtenir un taux d'estérification compris entre 50 et 100% et, de préférence, entre 70 et 90%. De façon préférentielle, on utilise 0,5 à 1,5 partie en poids du chlorure de benzyle pour 1 partie en poids du sel de benzéthonium de l'héparine. De même, de façon préférentielle, le temps de réaction
25 sera compris entre 10 et 35 heures.

La transalification de l'étape c) s'effectue au moyen d'un chlorure d'ammonium quaternaire et, de préférence, au moyen de chlorure de benzéthonium, de chlorure de cétylpyridinium ou de chlorure de cétyltriméthylammonium, en milieu aqueux, à une température comprise entre 10 et 25°C. De manière avantageuse, le rapport en mole
30 chlorure d'ammonium quaternaire/sel de sodium de l'ester benzylique de l'héparine est compris entre 2 et 3.

Les mélanges selon l'invention sous forme de sel de sodium, peuvent être transformés en un autre sel d'un métal alcalin ou alcalinoterreux. On passe éventuellement d'un sel à l'autre en utilisant la méthode décrite dans le brevet US-4168377.

5 Les mélanges selon l'invention ne sont pas toxiques et peuvent ainsi être utilisés comme médicaments.

10 Les mélanges de la présente invention peuvent être utilisés comme agents antithrombotiques. En particulier, ils sont utiles pour la prévention des thromboses veineuses, des accidents thrombotiques artériels, notamment dans le cas d'infarctus du myocarde. Ils sont également utiles dans la prévention et le traitement de la prolifération des cellules musculaires lisses, l'angiogénèse, et comme agent neuroprotecteurs de l'athérosclérose et de l'artériosclérose.

La présente invention concerne également les compositions pharmaceutiques contenant comme principe actif un mélange de polysaccharides selon l'invention éventuellement en association avec un ou plusieurs excipients inertes.

15 Les compositions pharmaceutiques sont par exemple des solutions injectables par voie sous-cutanée ou intraveineuse. Elles sont également utiles par voie pulmonaire (inhalation).

20 La posologie peut varier en fonction de l'âge, du poids et de l'état de santé du patient. Pour un adulte, elle est en général comprise entre 20 et 100 mg par jour par voie intramusculaire ou sous-cutanée.

Les exemples suivants illustrent l'invention.

EXEMPLE A : PREPARATION DU SEL DE BENZETHONIUM DE L'ESTER BENZYLIQUE DE L'HEPARINE

Heparinate de benzéthonium

25 A une solution de 10 g d'héparine sous forme de sel de sodium dans 100 ml d'eau à une température voisine de 20°C, on ajoute une solution de 25 g de chlorure de benzéthonium dans 125 ml d'eau. Le produit est filtré, lavé à l'eau et séché.

Ester benzylique d'héparine (sel de sodium)

A une solution de 20 g d'héparinate de benzéthonium dans 80 ml de chlorure de méthylène, on ajoute 16 ml de chlorure de benzyle. La solution est chauffée à une température de 30°C pendant 12 heures. On ajoute alors 108 ml d'une solution à 10% d'acétate de sodium dans le méthanol, filtre, lave au méthanol et sèche. On obtient
5 ainsi 7,6 g d'ester benzylique d'héparine sous forme de sel de sodium dont le taux d'estérification est de 77%.

Ester benzylique d'héparine (sel de benzéthonium)

Dans un erlenmeyer A de 2 litres, on introduit 36 g (0,0549 mole) d'ester benzylique d'héparine (sel de sodium) et 540 ml d'eau distillée. Après homogénéisation à une
10 température d'environ 20°C, on obtient une solution jaune pâle. Sous agitation magnétique, on prépare dans un erlenmeyer B de 1 litre, une solution de 64,45 g (0,1438 mole) de chlorure de benzéthonium et de 450 ml d'eau. La solution de l'erlenmeyer B est coulée en environ 35 minutes dans la solution de l'erlenmeyer A sous agitation. On observe la formation d'un précipité blanc abondant. L'erlenmeyer B
15 est rincé avec 200 ml d'eau distillée et l'eau de lavage est introduite dans l'erlenmeyer A. L'agitation est alors arrêtée et on laisse déposer la suspension pendant 12 heures. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée. Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie), on ajoute 560 ml d'eau et on agite pendant 20 minutes. On laisse re-sédimer le précipité en 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté
20 (560 ml). Sur le précipité sédimenté, on renouvelle deux fois cette opération de lavage par environ 560 ml d'eau distillée. Dans la dernière opération de lavage, on laisse le précipité en suspension et on filtre sur Verre Fritté 3. Le gâteau est ensuite lavé par 4 fois 200 ml d'eau distillée. Le solide blanc humide est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on
25 obtient 87,5 g d'ester benzylique d'héparine, sel de benzéthonium. Le rendement obtenu est de 94,9%.

EXEMPLE 1

Dépolymérisation et transformation en sel de sodium :

Dans un erlenmeyer A de 50 ml, on introduit 28 ml de dichlorométhane. Sous
30 agitation, on charge lentement 4 g (0,00238 mole) d'ester benzylique d'héparine (taux d'estérification : 77%, sel de benzéthonium) obtenu comme décrit dans l'exemple A. Après dissolution complète, on ajoute 1,32 g (0,00948 mole) de 1,5,7-

triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ène. On agite à une température voisine de 20°C, pendant 3 heures et 30 minutes. Pendant ce temps, on prépare à 4°C dans un erlenmeyer B, une solution de 12 g d'acétate de sodium dans 120 ml de méthanol. Sous agitation magnétique, le mélange réactionnel de l'erlenmeyer A est coulé dans la solution

5 méthanolique d'acétate de sodium. Un précipité jaune gélatineux quasi-translucide apparaît. L'agitation est alors arrêtée et on laisse décanter la suspension pendant une heure. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée (62 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie jaune), on ajoute 50 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 30 minutes environ. Le surnageant

10 est prélevé et écarté (49 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 50 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur Verre Fritté 4. Le gâteau jaune d'or obtenu est ensuite lavé par 2 fois 25 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on obtient 1,21 g d'héparine

15 dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium). Le rendement obtenu est de 77,2%.

Saponification :

Dans un erlenmeyer de 25 ml, on introduit 1,21 g (0,0018 mole) de l'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium) obtenue précédemment et 11 ml d'eau. Sous agitation magnétique, on introduit 0,18 ml (0,0018 mole) de lessive de

20 soude à 30%. Après addition, le mélange est refroidi à 4°C et agité pendant 2 heures. On ajoute 1,43 g de NaCl et on neutralise la solution par ajout d'HCl à 1mole/l (14 ml). Le mélange est transvasé dans un erlenmeyer de 100 ml et 52 ml de méthanol sont ajoutés. On observe la formation d'un précipité jaune. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 12 heures à une température voisine de

25 20°C. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (44 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie jaune), on ajoute 25 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (21 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 25 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur Verre

30 Fritté 3. Le gâteau jaune clair obtenu est ensuite lavé par 2 fois 10 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on obtient 0,66 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 60%.

Purification :

Dans un erlenmeyer de 10 ml, on introduit 0,66 g d'héparine dépolymérisée brute obtenue précédemment et 5,9 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à 40°C sous agitation magnétique. Par addition de soude à 0,1 mole/l, on porte le pH entre 9 et 10 et on ajoute 33 microlitres d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 30%. Après environ 2 heures d'agitation, on ajoute 0,65 g de chlorure de sodium. Le mélange est ensuite neutralisé par ajout d'HCl à 0,1mole/l. La solution est ensuite filtrée et transvasée dans un erlenmeyer de 25 ml. On coule 23,3 ml de méthanol. On observe la formation d'un précipité blanc. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 12 heures à une température voisine de 20°C. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (5 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie), on ajoute 5 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (5 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 5 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur Verre Fritté 3. Le gâteau blanc obtenu est ensuite lavé par 2 fois 5 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on obtient 0,51 g d'un mélange purifié de polysaccharides (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 77,2%.

20 Les caractéristiques de ce mélange sont les suivantes :

Poids moléculaire moyen : 1600 daltons

Activité anti-Xa : 94 UI/mg

Activité anti-IIa : < 0,1 UI/mg

Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : > 100

25 EXEMPLE 2

Dépolymérisation et transformation en sel de sodium :

Dans un erlenmeyer A de 100 ml, on introduit 70 ml de dichlorométhane. Sous agitation, on charge lentement 10 g (0,00595 mole) d'ester benzylique d'héparine (taux d'estérification : 77%, sel de benzéthonium) obtenu comme décrit dans

l'exemple A. Après dissolution complète, on ajoute 1,7 ml (0,00587 mole) de 2-tert-butyrimino-2-diéthylamino-1,3-diméthyl-perhydro-1,3,2-diazaphosphorine. A une température voisine de 20°C, on laisse la réaction se poursuivre pendant environ 3 heures et 30 minutes. Pendant ce temps, on prépare à 4°C dans un erlenmeyer B, une solution de 30 g d'acétate de sodium dans 300 ml de méthanol. Sous agitation magnétique, le mélange réactionnel de l'erlenmeyer A est coulé dans la solution méthanolique d'acétate de sodium. Un précipité jaune gélatineux quasi-translucide apparaît. L'agitation est alors arrêtée et on laisse décanter la suspension pendant une heure. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée (204 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie jaune), on ajoute 125 ml de méthanol et on agit pendant 20 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (162 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 125 ml de méthanol et on agit pendant 20 minutes. Le précipité gélatineux en suspension est ensuite filtré sur Verre Fritté 3. Le gâteau gélatineux jaune obtenu est ensuite lavé par 2 portions de 63 ml de méthanol. Le solide gélatineux est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on obtient 3,34 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium). Le rendement obtenu est de 85,3%.

Saponification :

On saponifie 1,67 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium) précédemment obtenue selon le procédé de saponification décrit dans l'exemple 1. On obtient 0,94 g d'une poudre jaune clair. Le rendement en héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) est de 61%.

Purification :

On purifie 0,94 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) précédemment obtenue selon le procédé de purification décrit dans l'exemple 1. On obtient 0,71 g d'une poudre blanche. Le rendement est de 75,5%.

Le mélange purifié de polysaccharides (sel de sodium) obtenu présente les caractéristiques suivantes :

Poids moléculaire moyen : 2500 Daltons

Activité anti-Xa : 146,6 UI/mg

Activité anti-IIa : 2,15 UI/mg

Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : 68

EXEMPLE 3

Dépolymérisation et transformation en sel de sodium :

- 5 Dans un erlenmeyer A de 50 ml, on introduit 28 ml de dichlorométhane. Sous agitation, on charge lentement 4 g (0,00238 mole) d'ester benzylique d'héparine (taux d'estérification : 77%, sel de benzéthonium) obtenu selon l'exemple A. Après dissolution complète et refroidissement à 2°C, on ajoute 0,333 g (0,00239 mole) de 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ène. A une température voisine de 20°C, on laisse la
- 10 réaction se poursuivre pendant environ 3 heures et 30 minutes. Pendant ce temps, on prépare à 4°C dans un erlenmeyer B, une solution de 12 g d'acétate de sodium dans 120 ml de méthanol. Sous agitation magnétique, le mélange réactionnel de l'erlenmeyer A est coulé dans la solution méthanolique d'acétate de sodium. Un précipité jaune apparaît. L'agitation est alors arrêtée et on laisse décanter la
- 15 suspension pendant une heure. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée (90 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie jaune), on ajoute 50 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (61 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 50 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. Le précipité
- 20 en suspension est ensuite filtré sur Verre Fritté 4. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 2 fois 25 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on obtient 1,19 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium). Le solide est jaune intense. Le rendement obtenu est de 75,9%.

25 Saponification :

On saponifie 1,19 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium) précédemment obtenue selon le procédé de saponification décrit dans l'exemple 1. On obtient 0,78 g d'une poudre jaune clair. Le rendement en héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) est de 71,5%.

Purification :

On purifie 0,78 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) précédemment obtenue selon la méthode de purification décrite dans l'exemple 1. On obtient 0,58 g d'une poudre blanche. Le rendement est de 72,5%.

- 5 Le mélange purifié de polysaccharides (sel de sodium) obtenu présente les caractéristiques suivantes :

Poids moléculaire moyen : 2700 Daltons

Activité anti-Xa : 100,1 UI/mg

Activité anti-IIa : 3,3 UI/mg

- 10 Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : 27,3

EXEMPLE 4

Dépolymérisation et transformation en sel de sodium :

- Dans un erlenmeyer A de 50 ml, on introduit 28 ml de dichlorométhane. Sous agitation, on charge lentement 4 g (0,00238 mole) d'ester benzylique de l'héparine
- 15 (taux d'estérification : 77%, sel de benzéthonium) obtenu comme décrit dans l'exemple A. Après dissolution complète et à 2°C, on ajoute 0,6 ml (0,00222 mole) de 2-tert-butylimino-tris(diméthylamino)phosphorane. A une température voisine de 0°C, on laisse la réaction se poursuivre pendant environ 3 heures et 30 minutes. Pendant ce temps, on prépare à 4°C dans un erlenmeyer B, une solution de 12 g
- 20 d'acétate de sodium dans 120 ml de méthanol. Sous agitation magnétique, le mélange réactionnel de l'erlenmeyer A est coulé dans la solution méthanolique d'acétate de sodium. Un précipité jaune gélatineux quasi-translucide apparaît. L'agitation est alors arrêtée et on laisse décanter la suspension pendant une heure. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée (108 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de
- 25 bouillie jaunâtre), on ajoute 50 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (60 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 50 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. Le précipité blanc jaunâtre en suspension est ensuite filtré sur Verre Fritté 4. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 2 fois 25 ml de méthanol. Le

solide est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on obtient 1,22 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium). Le rendement obtenu est de 77,8 %.

Saponification :

- 5 On saponifie 1,22 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium) précédemment obtenue selon le protocole de saponification décrit dans l'exemple 1. On obtient 0,69 g d'une poudre jaune très clair. Le rendement en héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) est de 61,6%.

Purification :

- 10 On purifie 0,69 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) précédemment obtenue selon le protocole de purification décrit dans l'exemple 1. On obtient 0,67 g d'une poudre blanche. Le rendement est de 97,1%.

Le mélange purifié de polysaccharides (sel de sodium) obtenu présente les caractéristiques suivantes :

- 15 Poids moléculaire moyen : 2900 Daltons

Activité anti-Xa : 145,2 UI/mg

Activité anti-IIa : 4,5 UI/mg

Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : 32,6

EXEMPLE 5

- 20 Dépolymérisation et transformation en sel de sodium :

- 25 Dans un ballon A de 50 ml, on introduit 28 ml de dichlorométhane. Sous agitation, on charge lentement 4 g (0,00238 mole) d'héparinate de benzyle (taux d'estérification : 77%, sel de benzéthonium). Après dissolution complète et à 40°C, on ajoute 0,95 g (0,00949 mole) d'imidazolate de sodium. Au reflux du dichlorométhane, on laisse la réaction se poursuivre pendant environ 4 heures. Pendant ce temps, on prépare à 4°C dans un erlenmeyer B, une solution de 12 g d'acétate de sodium dans 120 ml de méthanol. Sous agitation magnétique, le mélange réactionnel de l'erlenmeyer A est

coulé dans la solution méthanolique d'acétate de sodium. Un précipité jaune gélatineux quasi-translucide apparaît. L'agitation est alors arrêtée et on laisse décanter la suspension pendant une heure. La partie limpide du surnageant orange est prélevée et écartée (88 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie orange), on ajoute
5 50 ml de méthanol et on agit pendant 20 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (51 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 50 ml de méthanol et on agit pendant 20 minutes. Le précipité orange en suspension est ensuite filtré sur Verre Fritté 4. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 2 fois 25 ml de méthanol. Le solide est essoré puis séché sous
10 pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on obtient 1,34 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium). Le rendement obtenu est de 76,6%.

Saponification :

On saponifie 1,2 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium)
15 précédemment obtenue selon le protocole de saponification décrit dans l'exemple 1. On obtient 0,63 g d'une poudre beige. Le rendement en héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) est de 52,5%.

Purification :

On purifie 0,63 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) précédemment
20 obtenue selon la méthode de purification décrite dans l'exemple 1. On obtient 0,42 g d'une poudre blanc beige. Le rendement est de 66,7%.

Le mélange purifié de polysaccharides (sel de sodium) obtenu présente les caractéristiques suivantes :

Poids moléculaire moyen : 2250 Daltons

25 Activité anti-Xa : 134,5 UI/mg

Activité anti-IIa : 1,5 UI/mg

Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : 90,5

EXEMPLE 6

Dépolymérisation et transformation en sel de sodium :

Dans un erlenmeyer A de 50 ml, on introduit 28 ml de dichlorométhane. Sous agitation, on charge lentement 4 g (0,00238 mole) d'ester benzylique d'héparine (taux d'estérification : 77%, sel de benzéthonium) obtenu comme décrit dans l'exemple A. Après dissolution complète, on ajoute 1,33 g (0,00956 mole) de 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5ène. On agite à une température voisine de 20°C, pendant 3 heures et 30 minutes. Pendant ce temps, on prépare à 4°C dans un erlenmeyer B, une solution de 12 g d'acétate de sodium dans 120 ml de méthanol. Sous agitation magnétique, le mélange réactionnel de l'erlenmeyer A est coulé dans la solution méthanolique d'acétate de sodium. Un précipité jaune gélatineux quasi-translucide apparaît. L'agitation est alors arrêtée et on laisse décanter la suspension pendant une heure. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée (56 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie jaune), on ajoute 60 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (70 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 50 ml de méthanol et on agite pendant 15 minutes. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur Verre Fritté 4. Le gâteau jaune d'or obtenu est ensuite lavé par 2 fois 50 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on obtient 0,92 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium). Le rendement obtenu est de 64 %.

Saponification :

Dans un erlenmeyer de 25 ml, on introduit 0,92 g (0,0014 mole) de l'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium) obtenue précédemment et 17,5 ml d'eau. Sous agitation magnétique, on introduit 0,38 ml (0,00379 mole) de lessive de soude à 30%. Après addition, le mélange est maintenu à une température voisine de 20°C et agité pendant 5 heures. On ajoute 1,8 g de NaCl et on neutralise la solution par ajout d'HCl à concentré (volume final de la solution environ 18 ml). Le mélange est transvasé dans un erlenmeyer de 100 ml et 46 ml de méthanol sont ajoutés. On observe la formation d'un précipité jaune. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 12 heures à une température voisine de 20°C. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (52 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie jaune), on ajoute 25 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. On

laisse re-sédimer le précipité 1 heure environ. Le surnageant est prélevé et écarté (27 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 25 ml de méthanol et on agite pendant 1 heure environ. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur Verre Fritté 4. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 2 fois 10 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 3 heures de séchage, on obtient 0,42 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 45,6 %.

Purification :

Dans un erlenmeyer de 10 ml, on introduit 0,42 g d'héparine dépolymérisée brute obtenue précédemment et 3,8 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à 38°C sous agitation magnétique. Par addition de soude à 0,1 mole/l, on porte le pH entre 9 et 10 et on ajoute 25 microlitres d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 30%. Après environ 2 heures 30 minutes d'agitation, on ajoute 0,5 g de chlorure de sodium. Le mélange est ensuite neutralisé par ajout d'HCl à 0,1mole/l. La solution est ensuite filtrée et transvasée dans un erlenmeyer de 25 ml. On coule 11,3 ml de méthanol. On observe la formation d'un précipité blanc. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 12 heures à une température voisine de 20°C. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (9,8 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie), on ajoute 5 ml de méthanol et on agite pendant 15 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 3 heures environ. Le surnageant est prélevé et écarté (6,2 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 5 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur Verre Fritté 3. Le gâteau blanc obtenu est ensuite lavé par 2 fois 5 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après environ 2 heures 20 minutes de séchage, on obtient 0,39 g d'héparine dépolymérisée pure (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 92,8%.

Les caractéristiques de l'héparine dépolymérisée ainsi obtenue sont les suivantes :

Poids moléculaire moyen : 1950 daltons

Activité anti-Xa : 115,6 UI/mg

30 Activité anti-IIa : < 2 UI/mg

Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : > 57

EXEMPLE 7

Dépolymérisation et transformation en sel de sodium :

Dans un réacteur A de 400 ml, on introduit 140 ml de dichlorométhane. Sous agitation, on charge lentement 20 g (0,0119 mole) d'ester benzylique d'héparine (taux d'estérification : 77%, sel de benzéthonium) obtenu comme décrit dans l'exemple A. Après dissolution complète, on mesure la teneur en eau du milieu réactionnel par la méthode de Karl Fisher. La valeur obtenue est de 0,1% d'eau. On ajoute alors 3,5 ml (0,0121 mole) de 2-tert-butylimino-2-diéthylamino-1,3-diméthyl-perhydro-1,3,2-diazaphosphorine. A une température voisine de 25°C, on laisse la réaction se poursuivre pendant environ 24 heures. Pendant ce temps, on prépare à 4°C dans un erlenmeyer B, une solution de 30 g d'acétate de sodium dans 300 ml de méthanol. Sous agitation magnétique, la moitié du mélange réactionnel du réacteur A est coulé dans la solution méthanolique d'acétate de sodium. Un précipité jaune gélatineux quasi-translucide apparaît. L'agitation est maintenue pendant une heure et on laisse décanter la suspension pendant environ 12 heures à 4°C. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée (220 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie jaune), on ajoute 220 ml de méthanol et on agite pendant 50 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 40 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (204 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 204 ml de méthanol et on agite pendant 40 minutes. Le précipité gélatineux en suspension est ensuite filtré sur Verre Fritté 3. Le gâteau gélatineux jaune obtenu est ensuite lavé par 2 portions de 100 ml de méthanol. Le solide gélatineux est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après environ 12 heures de séchage, on obtient 2,6 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium). Le rendement obtenu est de 70,6 % (calculé sur la base de la moitié du milieu réactionnel traité).

Saponification :

On saponifie 2,6 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium) précédemment obtenue selon le procédé de saponification décrit dans l'exemple 1. On obtient 1,48 g d'une poudre jaune clair. Le rendement en héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) est de 62,9%.

Purification :

Dans un erlenmeyer de 50 ml, on introduit 1,48 g d'héparine dépolymérisée brute obtenue précédemment et 15 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à 40°C sous agitation magnétique. Par addition de soude à 1 mole/l, on porte le pH entre 9 et 10. La solution est filtrée sur une membrane filtrante de porosité 1 µm. On ajoute ensuite
5 76 microlitres d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 30%. Après environ 2 heures d'agitation, on ajoute 1,5 g de chlorure de sodium. Le mélange est ensuite neutralisé par ajout d'HCl à 1mole/l. La solution est filtrée sur une membrane filtrante de porosité 1 µm. On coule 38 ml de méthanol. On observe la formation d'un précipité blanc. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension
10 pendant 1 heures à une température voisine de 20°C. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (37 ml). Sur le précipité, on ajoute 37 ml de méthanol et on agite pendant 45 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 45 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (34 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 34 ml de méthanol et on agite pendant 15 minutes. Le précipité en suspension est ensuite
15 filtré sur Verre Fritté 3. Le gâteau blanc obtenu est ensuite lavé par 2 fois 25 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on obtient 1,29 g d'héparine dépolymérisée pure (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 87,2%.

L'héparine dépolymérisée purifiée (sel de sodium) obtenue présente les
20 caractéristiques suivantes :

Poids moléculaire moyen : 2250 Daltons

Activité anti-Xa : 149 ,6 UI/mg

Activité anti-IIa : 0,85 UI/mg

Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : 176

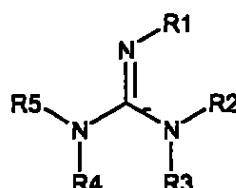
REVENDEICATIONS

- 1 - Mélanges de polysaccharides sulfatés possédant la structure générale des polysaccharides constitutifs de l'héparine et présentant les caractéristiques suivantes :
- ils ont un poids moléculaire moyen de 1500 à 3000 daltons, une activité anti-Xa de 100 à 150 UI/mg, une activité anti-IIa de 0 à 10 UI/mg et un rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa supérieur à 10,
 - les polysaccharides constitutifs des mélanges contiennent 2 à 26 motifs saccharidiques et ont un motif acide glucuronique-4,5 insaturé 2-O-sulfate à l'une de leurs extrémités,
- 10 sous forme d'un sel de métal alcalin ou alcalinoterreux.
- 2- Mélanges selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'activité anti Xa est comprise entre 125 et 150 UI/mg
- 3- Mélanges selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que l'activité anti Xa est comprise entre 140 et 150 UI/mg et le poids moléculaire moyen est compris entre 2000 et 3000 dalton
- 15 4 - Mélanges selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 sous forme de sel de sodium, de potassium, de calcium ou de magnésium.
- 5 - Mélanges selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ayant une activité anti-IIa de 0 à 5 UI/mg.
- 20 6 - Mélanges selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 présentant un rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa supérieur à 25.
- 7 - Procédé de préparation des mélanges de la revendication 1 caractérisé en ce que l'on dépolymérise un sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine en milieu organique, au moyen d'une base organique forte de pka supérieur à 20 ou d'imidazolate de sodium, transforme le sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine dépolymérisée en sel de sodium, saponifie l'ester et éventuellement purifie le produit.
- 25

8 - Procédé selon la revendication 7 pour lequel le sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine est le sel de benzéthonium, de cétypyridinium ou de cétyltriméthylammonium.

5 9 - Procédé selon la revendication 7 pour lequel la base organique forte de pKa supérieur à 20 est choisie parmi le 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ène, la 2-tert-butylimino-2-diéthylamino-1,3-diméthylperhydro-1,3,2-diazaphosphorine, les bases de la famille de la guanidine et des phosphazènes,

10 - Procédé selon la revendication 9 pour lequel les bases de la famille des guanidines sont celles de formule :



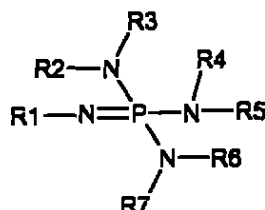
10

dans laquelle R₁ est hydrogène ou alkyle, R₂, R₃, R₄ et R₅ identiques ou différents représentent chacun un radical alkyle, les radicaux alkyle ayant 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée.

11 - Procédé selon la revendication 10 pour lequel R₁ est hydrogène et R₂, R₃, R₄ et R₅ sont des radicaux méthyle.

15

12 - Procédé selon la revendication 9 pour lequel les bases de la famille des phosphazènes sont celles de formule :



20 dans laquelle les radicaux R₁ à R₇ sont identiques ou différents et représentent des radicaux alkyle contenant 1 à 6 atomes de carbone, en chaîne droite ou ramifiée.

13 - Procédé selon l'une des revendications 7 à 12 pour lequel le rapport en mole base organique forte de pKa supérieur à 20 ou imidazolate de sodium/sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine est compris entre 0,2 et 5.

- 14 - Procédé selon l'une des revendications 7 à 13 pour lequel le sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine a un taux d'estérification compris entre 50 et 100%.
- 5 15 - Procédé selon l'une des revendications 7 à 14 pour lequel la transformation du sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine dépolymérisée en sel de sodium est effectuée par traitement du milieu réactionnel avec une solution alcoolique d'acétate de sodium.
- 16 - Procédé selon l'une des revendications 7 à 15 pour lequel la saponification s'effectue au moyen d'un hydroxyde de métal alcalin.
- 10 17 - Procédé selon l'une des revendication 7 à 16 pour lequel la purification s'effectue au moyen de peroxyde d'hydrogène.
- 18 - Mélanges tels que définis à l'une quelconque des revendications 1 à 6 à titre de médicaments .
- 15 19 - Mélanges tels que définis à l'une quelconque des revendications 1 à 6 à titre de médicaments antithrombotiques
- 20 - Compositions pharmaceutiques comprenant en tant que principe actif un mélange selon l'une des revendications 1 à 6.

MEZCLAS DE POLISACARIDOS DERIVADOS DE HEPARINA, SU PREPARACIÓN Y LAS COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE LOS CONTIENEN

La presente invención se relaciona con las mezclas de polisacáridos derivados de heparina, su procedimiento de preparación y las composiciones farmacéuticas que los contienen.

La heparina es una mezcla de mucopolisacáridos sulfatados de origen animal, utilizada especialmente por sus propiedades anticoagulantes y antitrombóticas.

Sin embargo la heparina presenta inconvenientes que limitan las condiciones de su utilización. Especialmente, su importante actividad anticoagulante (actividad anti-IIa) puede ocasionar hemorragias.

Se propusieron heparinas de bajo peso molecular obtenidas mediante despolimerización básica de ésteres de heparina (EP40144); sin embargo, estos productos siguen teniendo una importante actividad anti-IIa.

La invención se relaciona con mezclas de polisacáridos derivados de heparina que posee una actividad mas selectiva con respecto al factor X activado (factor Xa) y del factor II activado (factor IIa) que la heparina.

Mas específicamente, la presente invención tiene por objeto las mezclas de polisacáridos sulfatados con la estructura general de los polisacáridos constitutivos de la heparina y con las siguientes características:

- tienen un peso molecular promedio de 1.500 a 3.000 daltones, una actividad anti-Xa de 100 a 150 UI/mg, una actividad anti-IIa de 0 a 10 UI/mg y una relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa superior a 10,

- los polisacáridos constitutivos de las mezclas contienen 2 a 26 motivos sacarídicos y un motivo ácido glucurónico-4,5 no saturado 2-O-sulfato en uno de sus extremos,

bajo la forma de una sal de metal alcalino o alcalinoterroso.

Como sal de metal alcalino o alcalinoterroso, se prefiere las sales de sodio, potasio, calcio y magnesio.

El peso molecular promedio se determina mediante cromatografía líquida alta presión utilizando 2 columnas en serie por ejemplo aquellas comercializadas bajo el nombre de TSK G3.000 XL y TSK G2.000 XL. Se realiza la detección mediante refractometría. El eluyente utilizado es el nitrato de litio y el caudal es de 0.6 ml/min. Se calibra el sistema con estándares preparados mediante fraccionamiento de la enoxaparina (AVENTIS) mediante cromatografía sobre gel de agarosa-poliacrilamida (IBF). Se realiza esta preparación mediante la técnica descrita por Barrowcliffe y coll., *Thromb. Res.*, 12, 27-36 (1977-78) o D.A. Lane y coll., *Thromb. Res.*, 12, 257-271 (1977-78) se obtiene los resultados con la ayuda del software GPC8 (Perkin Elmer).

Se mide la actividad anti-Xa mediante el método amidolítico sobre un sustrato cromogénico descrito por Teien y coll., *Thromb. Res.*, 10, 399-410 (1977), utilizando como patrón el primer patrón internacional de las heparinas de bajo peso molecular.

Se mide la actividad anti-IIa mediante la técnica descrita por Anderson L.O. y coll., *Thromb. Res.*, 15, 531-541 (1979), utilizando como patrón el primer patrón internacional de las heparinas de bajo peso molecular.

Preferiblemente, las mezclas tales y como descritas anteriormente presentan una actividad anti-Xa comprendida entre 125 y 150 UI/mg.

Mas específicamente, las mezclas tales y como descritas anteriormente presentan una actividad anti-Xa comprendida entre 140 y 150 UI/mg y tienen un peso molecular promedio comprendido entre 2.000 y 3.000 daltones.

Preferiblemente, las mezclas según la invención tienen una actividad anti-IIa de 0 a 5 UI/mg.

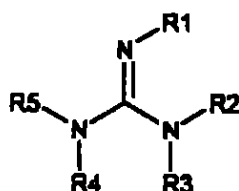
Todavía con más preferencia, las mezclas presentan una relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa superior a 25.

Las mezclas de oligosacáridos según la invención se pueden preparar mediante despolimerización de una sal de amonio cuaternario del éster bencilico de la heparina en medio orgánico, por medio de una base orgánica fuerte de pka superior a 20 o de imidazolato de sodio, transformación de la sal de amonio cuaternario del éster bencilico de la heparina despolimerizada en sal de sodio, saponificación del éster y eventualmente purificación.

La sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina es preferiblemente la sal de benzetonio, cetilpiridinio o cetiltrimetilamonio.

La despolimerización se efectúa generalmente dentro de un disolvente orgánico inerte tal y como un disolvente clorado (diclorometano por ejemplo), el tetrahidrofurano, el anisol con una temperatura de -20°C a 40°C .

Como base orgánica fuerte de pka superior a 20, se puede utilizar el 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]des-5-eno, la 2-tert-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,3,2-diazafosforina, las bases de la familia de la guanidina y de los fosfozenos.

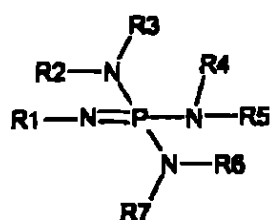


Las bases de la familia de las guanidinas son preferiblemente aquellas de fórmula: en la cual R_1 es hidrógeno o alquilo, R_2 , R_3 , R_4 y R_5 idénticos o diferentes representan cada uno un radical alquilo.

Más específicamente, R_1 es hidrógeno y R_2 , R_3 , R_4 y R_5 son radicales metilo.

Las bases orgánicas fuertes pertenecientes a la familia de los fosfazenos se definen por ejemplo según R. Schwesinger y coll., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 26, 1167-1169 (1987), R. Schwesinger y coll., Angew. Chem. 105, 1420 (1993).

Entre las bases de la familia de los fosfazenos se utiliza preferiblemente aquellas de fórmula:



En la cual los radicales R_1 a R_7 son idénticos o diferentes y representan radicales alquilo.

En las fórmulas anteriores, los radicales alquilo contienen 1 a 6 átomos de carbono en cadena alineada o ramificada.

Ventajosamente la relación en mol base orgánica fuerte de pKa superior a 20 o imidazolato de sodio/sal de amonio cuaternario del éster bencilico de heparina está comprendida entre 0.2 y 5 y, preferiblemente, entre 1 y 4.

Más específicamente, la tasa de esterificación de la sal de amonio cuaternario del éster bencilico de la heparina está comprendida entre el 50 y el 100%, y preferiblemente, entre el 70 y 90%. Esta tasa de esterificación corresponde al porcentaje molar de esterificación de los ácidos urónicos de la heparina.

Generalmente, la transformación de la sal de amonio cuaternario del éster bencilico de la heparina despolimerizada en sal de sodio se efectúa mediante tratamiento del medio de reacción con una solución alcohólica de acetato de sodio y, preferiblemente, con una solución al 10% de acetato de sodio en el metanol (peso/volumen), a una temperatura comprendida entre los 15 y los 25°C. El equivalente en peso de acetato agregado es preferiblemente 3 veces superior a la masa de sal de amonio cuaternario del éster bencilico de la heparina involucrada en la reacción de despolimerización.

Generalmente, la saponificación se efectúa mediante un hidróxido de metal alcalino tal y como la sosa, la potasa, el hidróxido de litio en medio acuoso, a una temperatura comprendida entre 0 y 20°C y, preferiblemente, entre 0 y 10°C. Se utiliza de manera general de uno a 5 equivalentes molares de hidróxido de metal alcalino. Preferiblemente la saponificación se realizará en presencia de 2 a 3 equivalentes molares de hidróxido de metal alcalino.

Eventualmente, el producto final se puede purificar mediante cualquier método conocido de purificación de las heparinas despolimerizadas y especialmente según el método descrito en la patente EP 0037319. Preferiblemente, se purifica mediante el peróxido de hidrógeno, en medio acuoso, a una temperatura de 10 a 50°C. Preferiblemente, la anterior operación se realizará entre los 20 y 40°C.

La sal de amonio cuaternario del éster bencilico de la heparina se puede preparar según el siguiente esquema de reacción:

a) transformación de la heparina bajo la forma de sal de sodio por medio del cloruro de benzetonio para obtener el heparinato de benzetonio,

b) esterificación de la sal de benzetonio obtenida anteriormente mediante el cloruro de bencilo y tratamiento con una solución alcohólica de acetato de sodio para obtener la sal de sodio del éster bencílico de la heparina,

c) transalificación de la sal de sodio del éster bencílico de la heparina en sal de amonio cuaternario y, preferiblemente en sal de benzetonio, cetilpiridinio o cetiltrimetilamonio,

la reacción de la etapa a) se realiza en medio acuoso, mediante la acción del cloruro de benzetonio en exceso, sobre la heparina bajo la forma de sal de sodio, a una temperatura cercana a los 15 a 20°C ventajosamente la relación molar cloruro de benzetonio/heparina bajo la forma de sal de sodio está comprendida entre 2 y 3 y mas específicamente 2.5.

La heparina bajo la forma de sal de sodio de inicio utilizada es, preferiblemente una heparina de cerdo. Esta última puede ser previamente purificada para disminuir su tasa de dermatan sulfato que según el procedimiento descrito en la patente FR2663639.

La esterificación de la etapa b) se efectúa preferiblemente dentro de un disolvente orgánico clorado (cloroformo, cloruro de metileno por ejemplo), a una temperatura comprendida entre los 25 y 45°C y, preferiblemente, entre los 30 y los 40°C. Luego, se recupera el éster bajo la forma de sal de sodio mediante precipitación con acetato de sodio al 10% en peso/volumen en un alcohol tal y como el metanol. Generalmente, se utiliza 1 a 1.2 volumen de alcohol por volumen de medio de reacción. La cantidad de cloruro de bencilo y el tiempo de reacción se ajustan para obtener una tasa de esterificación comprendida entre el 50 y el 100% y, preferiblemente, entre el 70 y 90%. Preferiblemente, se utiliza 0.5 a 1.5 parte en peso del cloruro de bencilo por 1 parte en peso de la sal de benzetonio de la heparina. De la misma manera, preferiblemente, el tiempo de reacción estará comprendido entre 10 y 35 horas.

La transalificación de la etapa c) se efectúa mediante un cloruro de amonio cuaternario y, preferiblemente, mediante el cloruro de benzetonio, el cloruro de cetilpiridinio o el cloruro de cetiltrimetilamonio, en medio acuoso, a una temperatura comprendida entre los 10 y 25°C. De manera ventajosa, la relación en mol cloruro de amonio cuaternario/sal de sodio del éster bencílico de la heparina está comprendido entre 2 y 3.

Las mezclas según la invención bajo la forma de sal de sodio se pueden transformar en otra sal de un metal alcalino o alcalinoterroso. Eventualmente, se pasa de una sal a la otra utilizando el método descrito en la patente US4168377.

Las mezclas según la invención no son tóxicas y así se pueden utilizar como medicamentos.

Las mezclas de la presente invención se pueden utilizar como agentes antitrombóticos. Especialmente, son útiles para la prevención de las trombosis venosas, los accidentes trombóticos arteriales, especialmente en el caso del infarto del miocardio. Generalmente son útiles para la prevención y tratamiento de la proliferación de las células musculares lisas, la angiogénesis y como agentes neuroprotectores de la arteriosclerosis y la arteriosclerosis.

La presente invención se relaciona también con las composiciones farmacéuticas que contienen como principio activo una mezcla de polisacáridos según la invención eventualmente en asociación con uno o varios excipientes inertes.

Las composiciones farmacéuticas son por ejemplo soluciones inyectables por vía subcutánea o intravenosa. También son útiles por la vía pulmonar (inhalación).

La posología puede variar en función de la edad, el peso y el estado de salud del paciente. Para un adulto, generalmente está comprendida entre los 20 y 100 mg por día por vía intramuscular o subcutánea.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

EJEMPLO A: PREPARACIÓN DE LA SAL DE BENZETONIO DEL ESTER BENCILICO DE LA HEPARINA

Heparinato de benzetONIO

A una solución de 10 g de heparina bajo la forma de sal de sodio en 100 ml de agua a una temperatura cercana a los 20°C, se agrega una solución de 25 g de cloruro de benzetONIO en 125 ml de agua. Se filtra, se lava con agua y se seca el producto.

Ester bencilico de heparina (sal de sodio)

A una solución de 20 g de heparinato de benzetonio en 80 ml de cloruro de metileno, se agrega 16 ml de cloruro de bencilo. Se calienta la solución a una temperatura de 30°C durante 12 horas. Luego se agrega 108 ml de una solución al 10% de acetato de sodio en el metanol, se filtra, se lava con metanol y se seca. Se obtiene así 7.6 g de éster bencillico de heparina bajo la forma de sal de sodio cuya tasa de esterificación es del 77%.

Ester bencillico de heparina (sal de benzetonio).

En una matraz erlenmeyer A de 2 litros, se introduce 38 g (0.0549 mol) de éster bencillico de heparina (sal de sodio) y 540 ml de agua destilada. Después de homogenización a una temperatura cercana a los 20°C, se obtiene una solución color amarillo pálido. Bajo agitación magnética, se prepara en una matraz erlenmeyer B de 1 litro, una solución de 64.45 g (0.1438 mol) de cloruro de benzetonio y de 450 ml de agua. Se cuele la solución de la matraz erlenmeyer B en cerca de 35 minutos en la solución de la matraz erlenmeyer A bajo agitación. Se observa la formación de un precipitado blanco abundante. Se enjuaga la matraz erlenmeyer B con 200 ml de agua destilada y se introduce el agua del lavado en la matraz erlenmeyer A. Luego se detiene la agitación y se deja depositar la suspensión durante 12 horas. Se extrae y se separa la parte límpida del sobrenadante. Sobre el precipitado sedimentado (con aspecto de papilla), se agrega 560 ml de agua y se agita durante 20 minutos. Se deja sedimentar nuevamente el precipitado durante cerca de 30 minutos. Se extrae y se separa el sobrenadante (560 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se realiza nuevamente 2 veces esta operación de lavado con cerca de 560 ml de agua destilada. En la primera operación de lavado, se deja el precipitado en suspensión y se filtra sobre vidrio sinterizado 3. Luego se lava la torta con 4 veces 200 ml de agua destilada. Se escurre, luego se seca el sólido blanco húmedo bajo presión reducida (2.7 kPa), a una temperatura cercana a los 60°C. Después de 12 horas de secado, se obtiene 87.5 g de éster bencillico de heparina, sal de benzetonio. El rendimiento obtenido es del 94.9%.

EJEMPLO 1

Despolimerización y transformación en sal de sodio:

En una matraz erlenmeyer A de 50 ml, se introduce 28 ml de diclorometano. Bajo agitación, se carga lentamente 4 g (0.00238 mol) de éster bencillico de heparina (tasa de esterificación: 77%, sal de benzetonio) obtenido tal y como se describe en el ejemplo

4/

A. Después de disolución completa, se agrega 1.32 g (0.00948 mol) de 1,5,7-triazabicyclo [4.4.0]dec-5-eno. Se agita a una temperatura cercana a los 20°C, durante 3 horas y 30 minutos. Durante ese tiempo, se prepara a 4°C en una matraz erlenmeyer B, una solución de 12 g de acetato de sodio en 120 ml de metanol. Bajo agitación magnética, se cuela la mezcla de reacción de la matraz erlenmeyer A en la solución metanólica de acetato de sodio. Aparece un precipitado color amarillo gelatinoso casi translúcido. Se detiene la agitación y se deja decantar la suspensión durante 1 hora. Se extrae y se saca la parte límpida del sobrenadante (62 ml). Sobre el precipitado sedimentado (con aspecto de papilla color amarillo), se agrega 50 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Se deja sedimentar nuevamente el precipitado durante cerca de 30 minutos. Se extrae y se separa el sobrenadante (49 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se agrega 50 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Luego se filtra el precipitado en suspensión sobre vidrio sinterizado 4. Luego se lava la torta obtenida color amarillo oro con 2 veces 25 ml de metanol. Luego se escurre y se seca el sólido húmedo bajo presión reducida (2.7 kPa), a una temperatura cercana a los 60°C. Después de 12 horas de secado, se obtiene 1.21 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio). El rendimiento obtenido es del 77.2%.

Saponificación:

En una matraz erlenmeyer de 25 ml, se introduce 1.21 g (0.0018 mol) de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio) obtenida anteriormente y 11 ml de agua. Bajo agitación magnética, se introduce 0.18 ml (0.0018 mol) de lejía de sosa al 30%. Después de adición, se enfría la mezcla a 4°C y se agita durante 2 horas. Se agrega 1.43 g de NaCl y se neutraliza la solución mediante adición de HCl a 1 mol/l (14 ml). Se trasvasa la mezcla en una matraz erlenmeyer de 100 ml y se agrega 52 ml de metanol. Se observa la formación de un precipitado color amarillo. Luego se detiene la agitación y se deja sedimentar la suspensión durante 12 horas a una temperatura cercana a los 20°C. Luego se extrae y se separa el sobrenadante (44 ml). Sobre el precipitado sedimentado (con un aspecto de papilla color amarillo), se agrega 25 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Se deja sedimentar nuevamente el precipitado durante cerca de 30 minutos. Se extrae y se separa el sobrenadante (21 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se agrega 25 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Luego se filtra el precipitado en suspensión sobre vidrio sinterizado 3. Luego se lava la torta obtenida color amarillo claro con 2 veces 10 ml de metanol. Se escurre y se seca el sólido húmedo bajo presión reducida (2.7 kPa), a una temperatura cercana a los 60°

C. Después de 12 horas de secado, se obtiene 0.66 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio). El rendimiento obtenido es del 60%.

Purificación:

En una matraz de 10 ml, se introduce 0.66 g de heparina despolimerizada bruta obtenida anteriormente y 5.9 ml de agua destilada. Se lleva la mezcla a los 40° C bajo agitación magnética. Mediante adición de sosa a 0.1 mol/l, se lleva el pH entre 9 y 10 y se agrega 33 microlitros de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30%. Después de agitar durante cerca de 2 horas, se agrega 0.65 g de cloruro de sodio. Luego se neutraliza la mezcla mediante la adición de HCl a 0.1 mol/l. Luego se filtra y se transvasa la solución en una matraz erlenmeyer de 25 ml. Se cuele 23.3 ml de metanol. Se observa la formación de un precipitado blanco. En este punto se detiene la agitación y se deja sedimentar la suspensión durante 12 horas a una temperatura cercana a los 20°C. Luego se extrae y se separa el sobrenadante (5 ml). Sobre el precipitado sedimentado (con aspecto de papilla), se agrega 5 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Se deja sedimentar nuevamente el precipitado durante cerca de 30 minutos. Se extrae y se separa el sobrenadante (5 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se agrega 5 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Luego se filtra el precipitado en suspensión sobre vidrio sinterizado 3. Luego se lava la torta blanca obtenida con 2 veces 5 ml de metanol. Se escurre y luego se seca el sólido húmedo bajo presión reducida (2.7 kPa), a una temperatura cercana a los 60°C. Después de 12 horas de secado, se obtiene 0.51 g de una mezcla purificada de polisacáridos (sal de sodio). El rendimiento obtenido es del 77.2%.

Las características de esta mezcla son las siguientes:

Peso molecular promedio: 1.600 daltonés

Actividad anti-Xa: 94 UI/mg

Actividad anti-IIa: < 0.1 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/ actividad anti-IIa : > 100

EJEMPLO 2

Despolimerización y transformación en sal de sodio:

En una matraz erlenmeyer A de 100 ml, se introduce 70 ml de diclorometano. Bajo agitación, se carga lentamente 10 g (0.00595 mol) de éster bencílico de heparina (tasa de esterificación: 77%, sal de benzetonio) obtenido tal y como está descrito en el ejemplo A. Después de disolución completa, se agrega 1.7 ml (0.00587 mol) de 2-terbutilimino-2-dietilamino-1,3-dimetil-perhidro-1,3,2-diazafosforina. A una temperatura cercana a los 20°C, se continúa la reacción durante cerca de 3 horas y 30 minutos. Mientras tanto, se prepara a 4°C en una matraz erlenmeyer B, una solución de 30 g de acetato de sodio en 300 ml de metanol. Bajo agitación magnética, se cuela la mezcla de reacción de la matraz erlenmeyer A en la solución metanólica de acetato de sodio. Aparece un precipitado color amarillo gelatinoso casi traslucido. En este punto, se detiene la agitación y se deja decantar la suspensión durante 1 hora. Se extrae y se separa la parte límpida del sobrenadante (204 ml). Sobre el precipitado sedimentado (con aspecto de papilla color amarillo), se agrega 125 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Se deja sedimentar nuevamente el precipitado durante cerca de 30 minutos. Se extrae y se separa el sobrenadante (162 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se agrega 125 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Luego se filtra el precipitado gelatinoso en suspensión sobre vidrio sinterizado 3. Luego se lava la torta gelatinosa obtenida color amarillo con 2 porciones de 63 ml de metanol. Se escurre y luego se seca el sólido gelatinoso bajo presión reducida (2.7 kPa), a una temperatura cercana a los 60°C. Después de 12 horas de secado, se obtiene 3.34 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio). El rendimiento obtenido es del 85.3%.

Saponificación:

Se saponifica 1.67 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio) anteriormente obtenida según el procedimiento de saponificación descrito en el ejemplo 1. Se obtiene 0.94 g de un polvo amarillo claro. El rendimiento en heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) es del 61%.

Purificación:

Se purifica 0.94 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) anteriormente obtenida según el procedimiento de purificación descrito en el ejemplo 1. Se obtiene 0.71 g de un polvo blanco. El rendimiento es del 75.5%.

La mezcla purificada de polisacáridos (sal de sodio) obtenida presenta las siguientes características:

Peso molecular promedio: 2.500 daltones

Actividad anti-Xa: 146.6 UI/mg

Actividad anti-IIa: 2.15 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa: 68

EJEMPLO 3

Despolimerización y transformación en sal de sodio:

En una matraz erlenmeyer A de 50 ml, se introduce 28 ml de diclorometano. Bajo agitación, se carga lentamente 4 g (0.00238 mol) de éster bencílico de heparina (tasa de esterificación: 77%, sal de benzetonio) obtenido según el ejemplo A. Después de disolución completa y enfriamiento a los 2°C, se agrega 0.333 g (0.00239 mol) de 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-eno. A una temperatura cercana a los 20°C, se continúa la reacción durante cerca de 3 horas y 30 minutos. Mientras tanto, se prepara a los 4°C en una matraz erlenmeyer B, una solución de 12 g de acetato de sodio en 120 ml de metanol. Bajo agitación magnética se cuela la mezcla de reacción de la matraz erlenmeyer A en la solución metanólica de acetato de sodio. Aparece un precipitado color amarillo. En este punto se detiene la agitación y se deja decantar la suspensión durante 1 hora. Se extrae y se separa la parte límpida del sobrenadante (90 ml). Sobre el precipitado sedimentado (con aspecto de papilla color amarillo), se agrega 50 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Se deja sedimentar nuevamente el precipitado durante cerca de 30 minutos. Se extrae y se separa el sobrenadante (61 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se agrega 50 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Luego, se filtra el precipitado en suspensión sobre vidrio sinterizado 4. Luego, se lava la torta obtenida con 2 veces 25 ml de metanol. Luego, se escurre y se seca el sólido húmedo bajo presión reducida (2.7 kPa), a una temperatura cercana a los 60°C. Después de 12 horas de secado, se obtiene 1.19 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio). El sólido es de color amarillo intenso. El rendimiento obtenido es del 75.9%.

Saponificación:

Se saponifica 1.19 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio) anteriormente obtenida según el procedimiento de saponificación descrito en el ejemplo 1. Se obtiene 0.78 g de un polvo color amarillo claro. El rendimiento en heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) es del 71.5%

Purificación:

Se purifica 0.78 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) anteriormente obtenida según el método de purificación descrito en el ejemplo 1. Se obtiene 0.58 g de un polvo blanco. El rendimiento es del 72.5%.

La mezcla purificada de polisacáridos (sal de sodio) obtenida presenta las siguientes características:

Peso molecular promedio: 2.700 daltones

Actividad anti-Xa: 100.1 UI/mg

Actividad anti-IIa: 3.3 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa: 27.3

EJEMPLO 4**Despolimerización y transformación en sal de sodio:**

En una matriz erlenmeyer A de 50 ml, se introduce 28 ml de diclorometano. Bajo agitación, se carga lentamente 4 g (0.00238 mol) de éster bencilico de heparina (tasa de esterificación: 77%, sal de benzetonio) obtenido tal y como se describe en el ejemplo A. Después de disolución completa y a los 2°C, se agrega 0.06 ml (0.00222 mol) de 2-tert-butilimino-tris(dimetilamino) fosforano. A una temperatura cercana a 0°C, se continúa la reacción durante cerca de 3 horas y 30 minutos. Mientras tanto, se prepara a los 4°C en una matraz erlenmeyer B, una solución de 12 g de acetato de sodio en 120 ml de metanol. Bajo agitación magnética, se cuela la mezcla de reacción de la matraz erlenmeyer A en la solución metanólica de acetato de sodio. Aparece un precipitado color amarillo gelatinoso casi translucido. En este punto se detiene la agitación y se deja decantar la suspensión durante 1 hora. Se extrae y se separa la parte límpida del sobrenadante (108 ml). Sobre el precipitado sedimentado (con aspecto de papilla

amarillenta), se agrega 50 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Se deja sedimentar nuevamente el precipitado durante cerca de 30 minutos. Se extrae y se separa el sobrenadante (60 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se agrega 50 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Luego se filtra el precipitado blanco amarillento en suspensión sobre vidrio sinterizado 4. Luego se lava la torta obtenida con 2 veces 25 ml de metanol se escurre y se seca el sólido bajo presión reducida (2.7 kPa), a una temperatura cercana a los 60°C. Después de 12 horas de secado, se obtiene 1.22 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio). El rendimiento obtenido es del 77.8%.

Saponificación:

Se saponifica 1.22 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio) anteriormente obtenida según el protocolo de saponificación descrito en el ejemplo 1. Se obtiene 0.69 g de un polvo color amarillo muy claro. El rendimiento en heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) es del 61.6%.

Purificación:

Se purifica 0.69 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) anteriormente obtenida según el protocolo de purificación descrito en el ejemplo 1. Se obtiene 0.67 g de un polvo blanco. El rendimiento es de 97.1%.

La mezcla purificada de polisacáridos (sal de sodio) obtenida presenta las siguientes características:

Peso molecular promedio: 2.900 daltones

Actividad anti-Xa: 145.2 UI/mg

Actividad anti-IIa: 4.5 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa: 32.6

EJEMPLO 5

Despolimerización y transformación en sal de sodio:

En una matraz A de 50 ml, se introduce 28 ml de diclorometano. Bajo agitación, se carga lentamente 4 g (0.00238 mol) de heparinato de bencilo (tasa de esterificación:

77%, sal de benzetonio). Después de disolución completa y a 40°C, se agrega 0.95 g (0.00949 mol) de imidazolato de sodio. Al reflujo del diclorometano, la reacción sigue durante cerca de 4 horas. Mientras tanto, se para a 4°C en una matraz erlenmeyer B, una solución de 12 g de acetato de sodio en 120 ml de metanol. Bajo agitación magnética, se cuela la mezcla de reacción de la matraz erlenmeyer A en la solución metanólica de acetato de sodio. Aparece un precipitado gelatinoso casi traslúcido color amarillo. Luego, se detiene la agitación y se deja decantar la suspensión durante una hora. Se extrae y se separa (88 ml) la parte límpida del sobrenadante color naranja. Sobre el precipitado sedimentado (aspecto de papilla color naranja), se agrega 50 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Se deja sedimentar nuevamente el precipitado durante cerca de 30 minutos. Se extrae y se separa (51 ml) el sobrenadante. Sobre el precipitado sedimentado, se agrega 50 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Luego, se filtra el precipitado color naranja en suspensión sobre vidrio sinterizado 4. Luego se lava la torta obtenida con 2 veces 25 ml de metanol. Se escurre luego se seca el sólido bajo presión reducida (2.7 kPa), a una temperatura cercana a los 60°C. Después de secar durante 12 horas, se obtiene 1.34 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio). El rendimiento obtenido es del 76.6%.

Saponificación:

Se saponifica 1.2 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio) anteriormente obtenida según el protocolo de saponificación descrito en el ejemplo 1. Se obtiene 0.63 g de un polvo color beige. El rendimiento en heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) es del 52.5%.

Purificación:

Se purifica 0.63 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) anteriormente obtenida según el método de purificación descrito en el ejemplo 1. Se obtiene 0.42 g de un polvo color blanco beige. El rendimiento es del 66.7%.

La mezcla purificada de polisacáridos (sal de sodio) obtenida presenta las siguientes características:

Peso molecular promedio: 2.250 daltones

Actividad anti-Xa: 134.5 UI/mg

Actividad anti-IIa: 1.5 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa: 90.5

EJEMPLO 6

Despolimerización y transformación en sal de sodio:

En una matraz erlenmeyer A de 50 ml, se introduce 28 ml de diclorometano. Bajo agitación, se carga lentamente 4 g (0.00238 mol) de éster bencílico de heparina (tasa de esterificación: 77%, sal de benzetonio) obtenidos tal y como se describe en el ejemplo A. Después de disolución completa, se agrega 1.33 g (0.00958 mol) de 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-eno. Se agita a una temperatura cercana a los 20°C durante 3 horas y 30 minutos. Mientras tanto, se prepara a 4°C en una matraz erlenmeyer B, una solución de 12 g de acetato de sodio en 120 ml de metanol. Bajo agitación magnética, se cuela la mezcla de reacción de la matraz erlenmeyer A en la solución metanólica de acetato de sodio. Aparece un precipitado amarillo gelatinoso casi traslucido. En este punto se detiene la agitación y se deja decantar la suspensión durante una hora. Se extrae y se separa (56 ml) la parte límpida del sobrenadante. Sobre el precipitado sedimentado (aspecto de papilla amarilla), se agrega 60 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Se deja sedimentar nuevamente el precipitado durante cerca de 30 minutos. Se extrae y se separa (70 ml) el sobrenadante. Sobre el precipitado sedimentado, se agrega 50 ml de metanol y se agita durante 15 minutos. Luego se filtra el precipitado en suspensión sobre vidrio sinterizado 4. Luego se lava la torta obtenida color amarillo oro con 2 veces 50 ml de metanol. Se escurre luego se seca el sólido húmedo bajo presión reducida (2.7 kPa), a una temperatura cercana a los 60°C. Después de 12 horas de secado, se obtiene 0.92 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio). El rendimiento obtenido es del 64%.

Saponificación:

En una matraz erlenmeyer de 25 ml, se introduce 0.97 g (0.0014 mol) de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio) obtenida anteriormente y 17.5 ml de agua. Bajo agitación magnética, se introduce 0.38 ml (0.00379 mol) de lejía de sosa al 30%. Después de adición, se mantiene la mezcla a una temperatura cercana a los 20°C y se agita durante 5 horas. Se agrega 1.8 g de NaCl y se neutraliza la solución mediante adición de HCl concentrado (volumen final de la solución cerca de 18 ml). Se transvasa la mezcla en una matraz erlenmeyer de 100 ml y se agrega 46 ml de metanol. Se observa la formación d un precipitado color amarillo. En este punto se detiene la

agitación y se deja sedimentar la suspensión durante 12 horas a una temperatura cercana a los 20°C. Luego se extrae y se separa 52 ml el sobrenadante. Sobre el precipitado sedimentado (aspecto de papilla amarilla), se agrega 25 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Se deja sedimentar nuevamente el precipitado durante cerca de una hora. Se extrae y se separa (27 ml) el sobrenadante. Sobre el precipitado sedimentado, se agrega 25 ml de metanol y se agita durante cerca de una hora. Luego se filtra el precipitado en suspensión sobre vidrio sinterizado 4. Luego se lava la torta obtenida con 2 veces 10 ml de metanol. Luego se escurre y se seca el sólido húmedo bajo presión reducida (2.7 kPa), a una temperatura cercana a los 60°C después de secar durante 3 horas, se obtiene 0.42 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio). El rendimiento obtenido es del 45.6%.

Purificación:

En una matraz de 10 ml, se introduce 0.42 g de heparina despolimerizada bruta obtenida anteriormente y 3.8 ml de agua destilada. Se lleva la mezcla a los 38°C bajo agitación magnética. Mediante adición de sosa a 0.1 mol/l, se lleva el pH entre 9 y 10 y se agrega 25 microlitros de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30%. Después de agitar durante cerca de 2 horas y 30 minutos, se agrega 0.5 g de cloruro de sodio. Luego, se neutraliza la mezcla mediante adición de HCl a 0.1 mol/l. Luego se filtra y se transvasa la solución en una matraz erlenmeyer de 25 ml. Se cuele 11.3 ml de metanol. Se observa la formación de un precipitado blanco. En este punto se detiene la agitación y se deja sedimentar la suspensión durante 12 horas a una temperatura cercana a los 20°C. Luego se extrae y se separa (9.8 ml) el sobrenadante. Sobre el precipitado sedimentado (aspecto de papilla), se agrega 5 ml de metanol y se agita durante 15 minutos. Se deja sedimentar nuevamente el precipitado durante cerca de 3 horas. Se extrae y se separa (6.2 ml) el sobrenadante.

Sobre el precipitado sedimentado, se agrega 5 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Luego se filtra el precipitado en suspensión sobre vidrio sinterizado 3. Luego se lava la torta blanca obtenida con 2 veces 5 ml de metanol. Se escurre luego se seca el sólido húmedo bajo presión reducida (2.7 kPa), a una temperatura cercana a los 60°C. Después de cerca de 2 horas y 20 minutos de secado, se obtiene 0.39 g de heparina despolimerizada pura (sal de sodio). El rendimiento obtenido es del 92.8%.

Las características de la heparina despolimerizada así obtenida son las siguientes:

Peso molecular promedio: 1.950 daltones

Actividad anti-Xa: 115.6 UI/mg

Actividad anti-IIa: < 2 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa: >57

EJEMPLO 7

Despolimerización y transformación en sal de sodio:

En un reactor A de 400 ml, se introduce 140 ml de diclorometano. Bajo agitación, se carga lentamente 20 g (0.0119 mol) de éster bencilico de heparina (tasa de esterificación: 77%, sal de benzetonio) obtenido tal y como se describe en el ejemplo A. Después de disolución completa, se mide el porcentaje en agua del medio de reacción mediante el método de Karl Fisher. El valor obtenido es de 0.1% de agua. Luego, se agrega 3.5 ml (0.0121 mol) de 2-tert-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetil-perhidro-1,3,2-diazafosforina. A una temperatura cercana a los 25°C, sigue la reacción durante cerca de 24 horas. Mientras tanto, se prepara a 4°C en una matraz erlenmeyer B, una solución de 30 g de acetato de sodio en 300 ml de metanol. Bajo agitación magnética, se cuela la mitad de la mezcla de reacción del reactor A en la solución metanólica de acetato de sodio. Aparece un precipitado amarillo gelatinoso casi translúcido. Se mantiene la agitación durante una hora y se deja decantar la suspensión durante cerca de 12 horas a 4°C. Se extrae y se separa (220 ml) la parte límpida del sobrenadante. Sobre el precipitado sedimentado (aspecto de papilla amarilla), se agrega 220 ml de metanol y se agita durante 50 minutos. Se deja sedimentar nuevamente el precipitado durante cerca de 40 minutos. Se extrae y se separa (204 ml) el sobrenadante. Sobre el precipitado sedimentado, se agrega 204 ml de metanol y se agita durante 40 minutos. Luego se filtra el precipitado gelatinoso en suspensión sobre vidrio sinterizado 3. Luego se lava la torta gelatinosa amarilla obtenida con 2 porciones de 100 ml de metanol. Se escurre luego se seca el sólido gelatinoso bajo presión reducida (2.7 kPa), a una temperatura cercana a los 60°C. Después de cerca de 12 horas de secado, se obtiene 2.6 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio). El rendimiento obtenido es del 70.6% (calculado sobre la base de la mitad del medio de reacción tratado).

Saponificación:

Se saponifica 2.6 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio) anteriormente obtenida según el procedimiento de saponificación descrito en el ejemplo 1. Se obtiene 1.48 g de un polvo color amarillo claro. El rendimiento en heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) es del 62.9%.

Purificación:

En una matraz erlenmeyer de 50 ml, se introduce 1.48 g de heparina despolimerizada bruta obtenida anteriormente y 15 ml de agua destilada. Se lleva la mezcla a los 40°C bajo agitación magnética. Mediante adición de sosa a 1 mol/l, se lleva el pH entre 9 y 10. Se filtra la solución sobre una membrana filtrante con una porosidad de 1 µm. Luego se agrega 76 microlitros de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30%. Después de agitar durante cerca de 2 horas, se agrega 1.5 g de cloruro de sodio. Luego se neutraliza la mezcla mediante la adición de HCl a 1 mol/l. Se filtra la solución sobre una membrana filtrante con una porosidad de 1 µm. Se cuela 38 ml de metanol. Se observa la formación de un precipitado blanco. En este punto se detiene la agitación y se deja sedimentar la suspensión durante una hora a una temperatura cercana a los 20°C. Luego se extrae y se separa (37 ml) el sobrenadante. Sobre el precipitado, se agrega 37 ml de metanol y se agita durante 45 minutos. Se deja sedimentar nuevamente el precipitado durante cerca de 45 minutos. Se extrae y se separa (34 ml) el sobrenadante. Sobre el precipitado sedimentado, se agrega 34 ml de metanol y se agita durante 15 minutos. Luego, se filtra el precipitado en suspensión sobre vidrio sinterizado 3. Luego se lava la torta blanca obtenida con 2 veces 25 ml de metanol. Se escurre luego se seca el sólido húmedo bajo presión reducida (2.7 kPa) a una temperatura cercana a los 60°C. Después de secar durante 12 horas, se obtiene 1.29 g de heparina despolimerizada pura (sal de sodio). El rendimiento obtenido es del 87.2%.

La heparina despolimerizada purificada (sal de sodio) obtenida presenta las siguientes características:

Peso molecular promedio: 2.250 daltones

Actividad anti-Xa: 149.6 UI/mg

Actividad anti-IIa: 0.85 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa: 176

REIVINDICACIONES

1 - Mezclas de polisacáridos sulfatados que poseen la estructura general de los polisacáridos constitutivos de la heparina y que presentan las siguientes características:

- tienen un peso molecular promedio de 1.500 a 3.000 daltones, una actividad anti-Xa de 100 a 150 UI/mg, una actividad anti-IIa de 0 a 10 UI/mg y una relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa superior a 10,

- los polisacáridos constitutivos de las mezclas contienen 2 a 26 motivos sacáridicos y tienen un motivo ácido glucurónico-4,5 insaturado 2-O-sulfato en uno de sus extremos,

bajo la forma de una sal de metal alcalino o alcalinoterroso.

2 - Mezclas según la reivindicación 1 que se caracteriza en que la actividad anti-Xa está comprendida entre 125 y 150 UI/mg

3 - Mezclas según la reivindicación 1 o 2 que se caracteriza en que la actividad anti-Xa está comprendida entre 140 y 150 UI/mg y el peso molecular promedio está comprendido entre 2.000 y 3.000 daltones.

4 - Mezclas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 bajo la forma de sal de sodio, potasio, calcio o magnesio.

5 - Mezclas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con una actividad anti-IIa de 0 a 5 UI/mg.

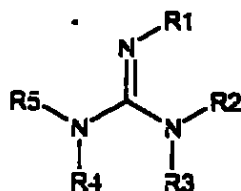
6 - Mezclas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que presentan una relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa superior a 25.

7 - Procedimiento de preparación de las mezclas de la reivindicación 1 que se caracteriza en que se despolimeriza una sal de amonio cuaternario del éster bencílico de heparina en medio orgánico, mediante una base orgánica fuerte de pka superior a 20 o de imidazolato de sodio, transforma la sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina despolimerizada en sal de sodio, saponifica el éster y eventualmente purifica el producto.

8 - Procedimiento según la reivindicación 7 para el cual la sal de amonio cuaternario del éster bencilico de heparina es la sal de benzetonio, cetilpiridinio o cetiltrimetilamonio.

9 - Procedimiento según la reivindicación 7 según la cual la base orgánica fuerte de pka superior a 20 se elige entre el 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-eno, la 2-tert-butylimino-2-diethylamino-1,3-dimethylperhydro-1,3,2-diazafosforina, las bases de la familia de la guanidina y de los fosfazenos.

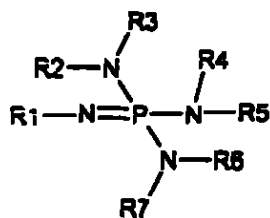
10 - Procedimiento según la reivindicación 9 según el cual las bases de la familia de los guanidinas son aquellas de fórmula:



en la cual R₁ es hidrógeno o alquilo, R₂, R₃, R₄ y R₅ idénticos o diferentes representan cada uno un radical alquilo, teniendo los radicales alquilo 1 a 6 átomos de carbono en cadena alineada o ramificada.

11 - Procedimiento según la reivindicación 10 para el cual R₁ es hidrógeno y R₂, R₃, R₄ y R₅ son radicales metilo.

12 - Procedimiento según la reivindicación 9 según el cual las bases de la familia de los fosfazenos son aquellas de fórmula:



En la cual los radicales R₁ a R₇ son idénticos o diferentes y representan radicales alquilo que contienen de 1 a 6 átomos de carbono en cadena alineada o ramificada.

13 - Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12 según el cual la relación en mol base orgánica fuerte de pKa superior a 20 o imidazolato de sodio/sal de amonio cuaternario del éster bencilico de heparina está comprendido entre 0.2 y 5.

14 - Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13 para el cual la sal de amonio cuaternario del éster bencilico de la heparina tiene una tasa de esterificación comprendida entre el 50 y 100%.

15 - Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14 para el cual la transformación de la sal de amonio cuaternario del éster bencilico de la heparina despolimerizada en sal de sodio se efectúa mediante tratamiento del medio de reacción con una solución alcohólica de acetato de sodio.

16 - Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15 para el cual la saponificación se efectúa por medio de un hidróxido de metal alcalino.

17 - Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 16 para el cual la purificación se efectúa por medio de peróxido de hidrógeno.

18 - Mezclas tales y como definidas en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 a título de medicamentos.

19 - Mezclas tales y como definidas en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 a título de medicamentos antitrombóticos.

20 - Composiciones farmacéuticas que contienen como principio activo una mezcla según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

ABOGADOS

OFICIO SISKI

CARRERA 4ª N° 72-35

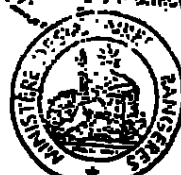
BOGOTÁ, D. C. COLOMBIA

AUX BREVETS, MARQUES D'USINE, MARQUES INDUSTRIELLES, marques de fabrique, de service, noms commerciaux, enseignes, slogans.

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, de servicio, nombres comerciales, enseñanzas, lemas comerciales.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION ET POUVOIR



LE MINISTRE DES AFFAIRES ÉCONOMIQUES
Certifie que la présente certification de signature
est conforme à la loi française
Pour le Ministre et par délégation

AVENTIS PHARMA S.A.

résidant (s) à/domiciliado (s) en Antony, France

por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñanzas, y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposición, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistír, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

par cet Instrument désigne à GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; et LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliés à Bogotá, Colombie, Carrera 4ª N° 72-35, conformément au paragraphe 1 de l'Article 543 du Code de Commerce, le premier comme principal et les autres comme suppléants, dans leur ordre, comme (mes) (nos) représentants dans toutes les affaires concernant la propriété industrielle ayant la faculté de recevoir les notifications et de nommer des mandataires judiciaires ou extrajudiciaires. Le premier représentant suppléant remplacera le principal en cas d'absence ou d'empêchement temporaire ou définitif de celui-ci. La même règle sera appliquée quand il faudra que le deuxième représentant suppléant remplace le premier, ou le troisième au deuxième. Dans ces cas, le représentant principal, ou le premier ou le deuxième suppléant dans leur cas, ou les deux, déclareront leur intention de ne pas exercer la représentation moyennant déclaration par devant Notaire Public en Colombie, ou par devant Notaire ou tout autre Fonctionnaire Public ou Consul de la Colombie à l'étranger; et s'il s'agissait d'empêchement, avec le certificat respectif. Si un des nommés venait à manquer définitivement, le suivant prendra sa place. Quand l'absence ou l'empêchement du représentant principal, ou de son premier ou second suppléant dans leur cas, aura cessé, ils pourront exercer leur représentation dans leur ordre, l'un ou les autres, suivant le cas, l'assumant par le seul fait de l'exercer, cessant à ce moment-là l'exercice de la représentation par le premier, deuxième ou troisième suppléant dans leur cas.

Par ailleurs je (nous) octroi (octroyons) pouvoir aux avocats ci-avant mentionnés pour obtenir la protection de ma (notre) propriété industrielle et contre la concurrence déloyale; à cet effet, autorise(ons) les dits fondés de pouvoir à me (nous) représenter devant toutes entités ou personnes, avec ou sans juridiction; particulièrement devant celles de l'ordre administratif, contentieux-administratif et judiciaire, ainsi que devant les Tribunaux d'Arbitrage, pour tout ce qui concerne les affaires suivantes: a) l'obtention de brevets d'invention, modèles d'utilité, dessins industriels; le dépôt de marques de fabrique, collectives, défensives, de service, slogans, noms commerciaux, enseignes, et dénominations d'origine; leur renouvellement, transfert, changement de nom ou domicile, radiation volontaire, et l'enregistrement des contrats de licence; b) les actions de concurrence déloyale, protection du consommateur, opposition, radiation administrative ou judiciaire, annulation, contrefaçon, licences, la tutelle, protection des secrets industriels, et les procès civils, pénaux, administratifs ou contentieux-administratifs ayant trait à ces droits; actions et procès établis par moi (nous) ou contre moi (nous); et c) afin que pour toutes les questions mentionnées ci-dessus, ils puissent substituer ce pouvoir, transiger, concilier, admettre les faits du procès, renoncer, et ratifier les actes des agents officiels ou personnes sans mandat.

Je soussigné M^r Hervé POMMERY

Notaire à Paris

Certifie matériellement

la signature de

M^{me} Magali LE PENNEC

Signé le/Dado y firmado hoy 31 octobre 2000

à/en Antony

Aventis Pharma S.A.

Fondé de Pouvoir

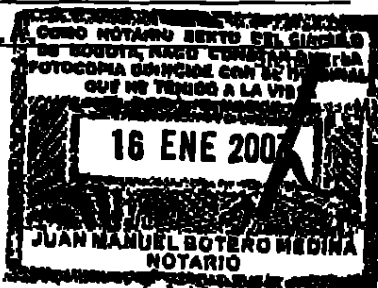
Apposée sur la présent document

AVENTIS PHARMA S.A.

Firma

© CAVELIER ABOGADOS

WPODERE-6 (MINUTA N° 12.1.1.3.2.f)



W

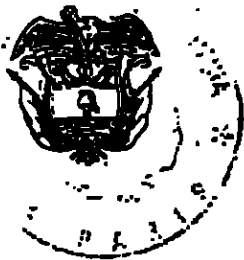
Magali LE PENNEC



COMO NOTARIO JEFTE DEL CIRCULO
DE BOGOTÁ, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

16-ENE 2005

JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO



CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA
PARIS, FRANCIA

No. 4576

París, Noviembre 30 de 2000

El suscrito Cónsul General de Colombia en París, vistos los documentos presentados por los interesados,

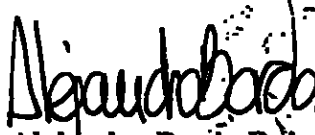
CERTIFICA:

Que el señor **Richard REQUENA**, quien constató que la autenticación de la firma del signatario del poder precedente fue efectuada de conformidad con la ley francesa, ejercía en la fecha las funciones de **Adjunto Administrativo de la Administración Central de la Dirección de los Franceses en el Exterior y de los Extranjeros en Francia del Ministerio de Asuntos Exteriores de Francia**, y que su firma corresponde con la registrada en este Consulado;

Que la compañía **AVENTIS PHARMA S.A.** es una sociedad constituida de acuerdo con las leyes de la República Francesa y que cumple con su objeto conforme a las mismas;

Que la señora **Magali LE PENNEC** quien en su calidad de **Apoderada de la citada compañía** otorga el poder precedente está legal y expresamente facultada para hacerlo.

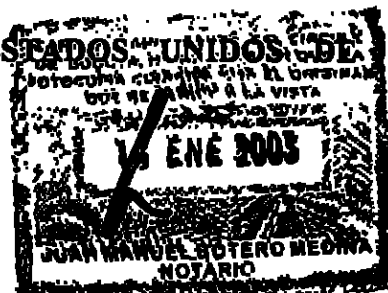
El Cónsul General no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.


Alejandro Borda Rojas
Cónsul General

Pagado Impuesto de Timbre por valor de **US\$7,00 (SIETE DOLARES DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA)**

Pagados Derechos Consulares por valor de **US\$15 (QUINCE DOLARES DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA)**

Total: **US\$22 (VEINTIDOS DOLARES DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA).**



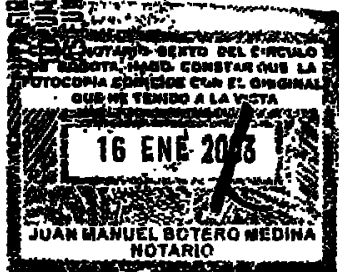
2-16 18-1-001-001-7

264/00

Transacción Oficial No.
JEAN - JACQUES H. TURPIN
Traductor e Interpreté Oficial
FRANCOIS - ESPANOL
Res. Minsterio No. 2680/91

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2000 DEC 22 A 10 20
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
608553
FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
FUNCIONES INDICADAS



57

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 264/00 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN FRANCÉS, EL CUAL PARA SU IDENTIFICACIÓN SE SELLA CON EL SELLO DEL TRADUCTOR. ESTA ES UNA TRADUCCIÓN OFICIAL EFECTUADA EL DÍA 14 DE DICIEMBRE DEL AÑO 2000 POR JEAN-JACQUES TURPIN, C.E.: 193849 DE BOGOTÁ, TRADUCTOR OFICIAL SEGUN RESOLUCIÓN No. 2680/91 DEL 19 DE DICIEMBRE DE 1991, EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA DE COLOMBIA.

Autenticaciones que se hallan a continuación de un documento de representación y poder conferido en francés y en español por AVENTIS PHARMA S.A. domiciliada en Antony, Francia, y otorgado a los Doctores Germán Cavellier TPA 832, Gonzalo Perdomo TPA 831, Emilio Ferrero TPA 31929 y Luz Clemencia de Paez, TPA 23555, todos domiciliados en Bogotá, Colombia, Carrera 4 No 72-35.

Dado en Antony, el 31 de octubre del 2000. Firma ilegible de Magali LE PENNEC.

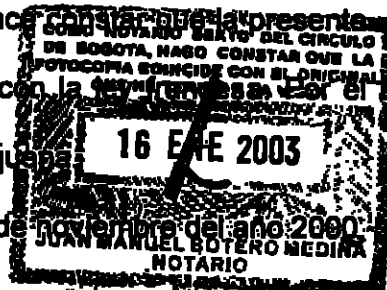
Sello: AVENTIS PHARMA S.A. Apoderada.

Legalización de la firma Magali LE PENNEC por el Señor Hervé Pommery, Notario en Paris. Firma del Notario.

Sello seco: Hervé Pommery – Notario asociado en Paris – Corte de apelación – República Francesa.

Sello en tinta del Ministerio de Relaciones Exteriores. Hace constar que la presente certificación de firma se ha efectuado de conformidad con la ley francesa por el Ministro y por delegación. Firmado (ilegible): Richard Requesens

Otro sello del Ministerio de Relaciones Exteriores del 29 de noviembre del año 2000 bajo el No.018302 - República Francesa 010.



Traducción Oficial No. 264/00
JEAN - JACQUES H. TURPIN
Traductor e Interpreté Oficial
FRANCS - ESPANOL
Res. Ministerio No. 2680/91

ANEXO EN ESPAÑOL

Certificación, por parte del Consulado General de Colombia en Paris, Francia, No.4576, del 30 de noviembre del año 2000, de la firma de Richard Requena quien desempeña las funciones de Adjunto Administrativo de la Administración Central de la Dirección de los Franceses en el Exterior y de los Extranjeros en Francia del Ministerio de Asuntos Exteriores de Francia. Además, certifica la existencia y representación de la compañía AVENTIS PHARMA S.A. y certifica que la Señora Magali LE PENNEC desempeña el cargo de Apoderada de dicha compañía y está facultada legal y expresamente para conferir el presente poder. Sello del Consulado General de Colombia en Paris. Pagado el impuesto de timbre por valor de veintidós dólares (US\$22.00). Sello y firma del Cónsul General, Alejandro Borda Rojas.

Legalización de la firma de Alejandro Borda Rojas por el Ministerio de Relaciones Exteriores en Bogotá No. 608553 del 12 de diciembre del año 2000. Firma y sello del Jefe de legalizaciones.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para confrontación y a la cual me remito.

Traducción oficial No. 264/00.

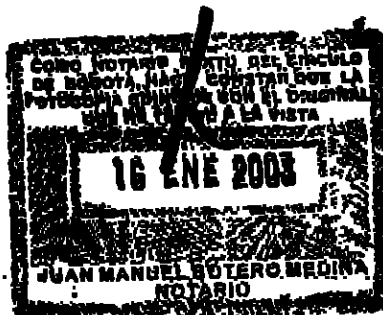
Colo: 12457-801-001-7

Traductor: Jean-Jacques Turpin.

Santafé de Bogotá, D.C., 14 de diciembre del año 2000.

Inducción Oficial No. 264/00
JEAN - JACQUES H. TURPIN
Traductor e Interpreté Oficial
FRANCOIS - ESPANOL
Res. Ministerio No. 2680/91





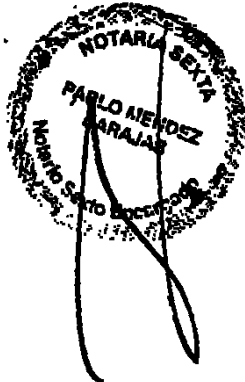
COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA. HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIRMA(S) PUESTA(S) POR

Jean Jacques H. Turpin.

IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s)

ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTAFE DE BOGOTA 15 DIC. 2000



TE DE AGUAS
COMISIONADO DEL NOTARIO

2000 DIC 18 A 10:05

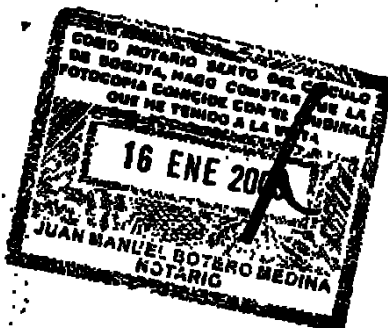
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE AGRICULTURA

EXTERIORES

494153

COPIA FIRMADA EN LA
OFICINA DE SI MIRA
LAS FIRMAS DE LOS



19

CAVELIER
ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier-abogados.com
E-MAIL: cavelier@colomsat.net.co

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

TELÉFONO: (57) (1) 347-3611
TELÉFAX: (57) (1) 317-9211 (57) (1) 310-4995

Señor Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

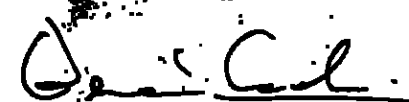
Poderdante: AVENTIS PHARMA S.A.

Poder conferido el: 31-10-2000

Yo, GERMAN CAVELIER, obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado, atentamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder que me ha sido conferido en la persona del doctor EMILIO FERRERO, Abogado con Tarjeta Profesional No. 31.929; con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil ya que los otros sustitutos faltan en este momento.

Señor Jefe,



GERMAN CAVELIER
T.P.A. No. 832

C.C. No. 2.877.924 de Bogotá

Acepto:



EMILIO FERRERO
T.P.A. N° 31.929
C.C. No. 438.019 de Usaquén



NOTARIA SEXTA DE BOGOTA
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL

Sede de Bogotá D. C. 09 NOV: 2000

Ante mí JUAN MANUEL BOTERO MEDINA

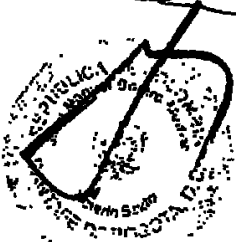
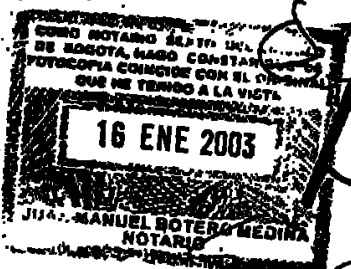
Nº FOLIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA

Compareció(eron) personalmente, German
Cavelier y Gerardo
Ferrero

quien(es) exhibió(eron) la(s) C. C. # 2.877.924 Bta
CC # 498.019.4529

y la(s) Libre(s) Militar(es): TP # 832
TP # 31.929

domiciliado(s) en Bogotá, y declaró(aron) que la(s) firma(s) que
aparece(n) en el presente documento es(son) la(s) suya(s), y que
el contenido del mismo es cierto.
En constancia se firma esta diligencia.





Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 03003331 00230600

Folios: 61

Fecha (HH): 2003-01-28 17:21:50

Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

~~Cob 12602 - B44 - 004 - 9~~

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 02 - 82,552
FECHA : DICIEMBRE 9 DE 2002

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	3136967	09/12/2002	19,350,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. HISTORICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	378,000.00
	TOTAL :	\$ 378,000.00

SON: TRESCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

RESPONSABLE :

~~Cob 12457 - B41 - 005 - 0~~

NIT : 806176009-2



61

Industria y Comercio

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 2.455
FECHA : ENERO 14 DE 2003

SUPERINTENDENCIA
SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Folios: 61

Radicacion : 83883331 00000000

Fecha (MM): 2003-01-20 17:21:50

***** COMSIGNACION *****
Tramite : 811 PCT-PATENT 379 FASE INICI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	3156969	14/01/2003	26,945,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. CONTABILITICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD :	999 VALOR COMPLEMENTO TARIFA AÑO ANTER	22,000.00
	TOTAL :	22,000.00

SON: VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE N°:

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

010 12457-841-005-0

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION	()	()
Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
Descripción de la invención.	()	()
Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA () **INCOMPLETA** ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()

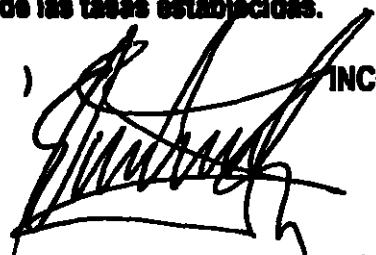
COMPLETA () **INCOMPLETA** ()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	()	()
Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA () **INCOMPLETA** ()

Firma Responsable:



SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Fecha: Radicación : 83003331 00000000 Folios: 51

Fecha (ACB): 2003-01-22 17:21:50

Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 41: PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES