

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RADICACIÓN EXPEDIENTE No 03-3331

EL EXTRACTO DE LA PRESENTE SOLICITUD DE **PATENTE DE INVENCION**

PCT FUE PUBLICADO EN LA GACETA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL No **544**

DE FECHA 30 DE **SEPTIEMBRE DE 2004** EL TERMINO HABIL SEÑALADO

POR LA LEY EXPIRA EL **29 DE DICIEMBRE DEL 2004**

NOTA: Dentro del plazo de los seis (6) meses siguientes a partir de la fecha de publicación en la gaceta de Propiedad Industrial, deberá solicitar y cancelar el examen de patentabilidad so pena de que la solicitud caiga en abandono, de acuerdo con lo establecido en el Artículo 44 de la Decisión 486/2000.

SE PRESENTARON OPOSICIONES POR PARTE DE TERCEROS.

SI _____

NO ___ _ **X** ___ _

Bogotá D.C, SEPTIEMBRE DE 2007

12

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

21 Numéro de dépôt: 81400728.2

51 Int. Cl.³: **C 08 B 37/10**
A 61 K 31/725

22 Date de dépôt: 08.05.81

30 Priorité: 14.05.80 FR 8010791

43 Date de publication de la demande:
18.11.81 Bulletin 81/46

84 Etats contractants désignés:
BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

71 Demandeur: PHARMINDUSTRIE
35 Quai du Moulin de Cage
F-92231 Gennevilliers(FR)

72 Inventeur: Mardiguian, Jean
3, Villa Christine
F-94210 La Varenne Saint-Hilaire(FR)

74 Mandataire: Houssin, Jean
P.C.U.K. - Produits Chimiques Uguine Kuhlmann Service
Propriété Industrielle Tour Manhattan - Cedex 21
F-92087 Paris La Defense 2(FR)

54 Nouveaux polysaccharides sulfatés, procédés pour leur préparation et leur utilisation comme médicaments.

57 Mélanges de polysaccharides sulfatés ayant la structure générale des polysaccharides constitutifs de l'héparine et dont les groupes acides sont sous forme libre ou salifiée, caractérisés en ce que les polysaccharides constitutifs desdits mélanges ont une double liaison éthylénique à l'un des bouts de la chaîne et en ce que les mélanges présentent, à l'état de sel de sodium, les caractéristiques suivantes:

- pourcentage de soufre : 9 à 13,5 %
- pourcentage d'azote : 1,8 à 2,5 %
- pourcentage d'acides uroniques : 20 % à 30 %
- poids moléculaire moyen en poids : 2 000 à 10 000 daltons
- pouvoir rotatoire spécifique en solution aqueuse à 20°C :

$$[\alpha]_{20}^D : 25^\circ \text{ à } + 55^\circ$$

Ces mélanges sont utilisables comme médicaments pour la prévention et le traitement des thromboses et pour le traitement de l'hyperlipémie.

EP 0 040 144 A1

0040144

- 4 -

magnésium.

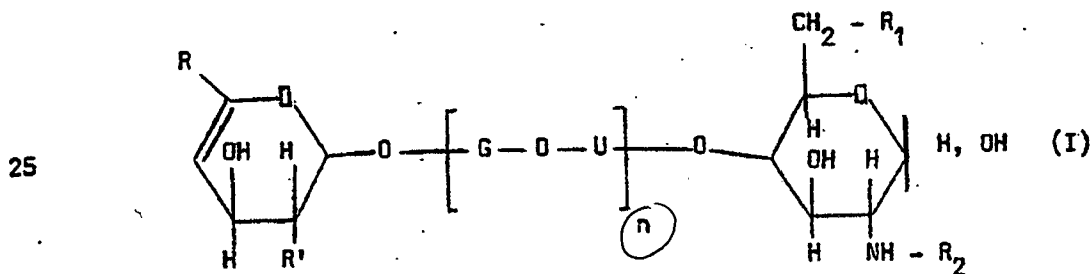
Les mélanges selon l'invention présentent, à l'état de sel de sodium, les caractéristiques suivantes :

- pourcentage de soufre : 9 % à 13,5 %
- pourcentage d'azote : 1,8 % à 2,5 %
- pourcentage d'acides uroniques : 20 % à 30 %
- poids moléculaire moyen en poids : 2 000 à 10 000 daltons
- pouvoir rotatoire spécifique en solution aqueuse à 20°C :

$$\left[\alpha \right]_D^{20} : +25^\circ \text{ à } +55^\circ$$

Les teneurs en soufre et en azote et le pouvoir rotatoire indiqués ci-dessus ont été déterminés par les méthodes de la pharmacopée française, 8ème édition, monographie héparine. La teneur en acides uroniques a été déterminée par la méthode de N. BLUMENKRANTZ et al. (Analytical Biochemistry, 54, 484, 1973). Le poids moléculaire moyen en poids a été déterminé par chromatographie par perméation de gel sur gel de polyacrylamide-agarose en se référant à des étalons constitués par des héparines de poids moléculaire moyen connu, selon la méthode de ANDERSON et al. (Thrombosis Research 9, 575, 1976).

Les polysaccharides constitutifs des mélanges selon l'invention répondent en particulier à la formule :



dans laquelle R désigne un atome d'hydrogène ou un groupe carboxylique, sous forme acide ou sous forme salifiée, R' désigne un groupe OH ou un groupe sulfate, sous forme acide ou sous forme salifiée, R₁ désigne un groupe OH ou un groupe sulfate, sous forme acide ou sous forme salifiée, R₂ désigne un groupe sulfonate, sous forme acide ou sous forme salifiée,

0040144

- 7 -

plasma de bovin citraté déplaquetté de façon à obtenir des concentrations en produit à tester (ou en étalon) de 0 à 4 $\mu\text{g/ml}$.

- 5 A 100 μl de la solution ainsi réalisée on ajoute 100 μl de réactif "automated APTT Precibio" (réactif à base de phospholipides de cerveau de lapin et de silice micronisée) et, après une incubation de 5 minutes à 37°C, 100 μl d'une solution aqueuse 0,025 M de chlorure de calcium. On mesure le temps de coagulation à l'aide d'un fibromètre Bio-Mérieux.

- 10 En traçant les courbes qui donnent le logarithme du temps de coagulation en fonction de la concentration d'une part dans le cas du produit à tester, d'autre part dans le cas de l'étalon, on obtient deux droites. L'activité du produit à tester, exprimée en unités internationales par mg, est donnée par la formule :

$$173 \frac{\text{pente de la droite relative au produit à tester}}{\text{pente de la droite relative à l'étalon}}$$

- 15 le chiffre 173 correspondant à la valeur de l'activité pour le 3ème étalon international.

Toutes les activités figurant dans les tableaux A, B et C sont exprimées en unités internationales par mg (u.i./mg), en se référant au 3ème étalon international.

- 20 Les mélanges selon l'invention sont préparés par action d'une base minérale ou organique sur un ester d'héparine résultant de l'estérification partielle ou totale des groupes acide carboxylique de l'héparine. Dans cet ester les groupes acides de l'héparine non estérifiés (c'est-à-dire les groupes sulfate acide et éventuellement une partie des groupes
- 25 acide carboxylique) peuvent être à l'état libre ou sous forme de sel, en particulier de sel alcalin tel que le sel de sodium, de sel alcalino-terreux tel que le sel de calcium, de sel de magnésium ou de sel d'ammonium quaternaire à longue chaîne tel que le sel de benzéthonium.

- 30 Dans le cas où l'ester d'héparine est soluble dans l'eau (cas par exemple où les groupes acides non estérifiés sont sous forme de sel de sodium), la réaction entre l'ester et la base peut être effectuée dans

0040144

- 8 -

- l'eau, à une température de 20°C à 80°C, la concentration molaire de la base dans le milieu étant de préférence comprise entre 0,1 et 0,6. Comme bases utilisables on peut citer les bases solubles dans l'eau et en particulier l'hydroxyde de sodium, l'hydroxyde de potassium, les
- 5 carbonates alcalins, la triéthylamine, la triéthylènediamine, la quinuclidine, le diaza-1,5 bicyclo [4.3.0] nonène-5 et le diaza-1,5 bicyclo [5.4.0] undecène-5. Une fois la réaction terminée, on isole le ^{purifié} produit de dépolymérisation formé, par exemple par précipitation par addition de chlorure de sodium, puis de méthanol.
- 10 La réaction entre l'ester et la base peut également être effectuée, en particulier dans le cas où les groupes acides non estérifiés de l'ester sont sous forme de sel d'ammonium quaternaire à longue chaîne, dans un solvant organique inerte dudit ester, tel que par exemple le dichlorométhane, le diméthylformamide, le formamide ou le tétrahydrofurane, à
- 15 une température de préférence de 20°C à 80°C. Comme bases utilisables on peut citer les bases solubles dans le solvant utilisé et en particulier le diaza-1,5 bicyclo [4.3.0] nonène-5, la quinuclidine et le diaza-1,5 bicyclo [5.4.0] undecène-5. Une fois la réaction terminée, on isole le produit de dépolymérisation formé, dans lequel les groupes
- 20 acide carboxylique sont encore estérifiés, à l'état de sel alcalin, et l'hydrolyse par une solution aqueuse d'hydroxyde alcalin, en particulier d'hydroxyde de sodium, au moins 1N, à basse température (0°C à +5°C). Le produit final est séparé, par exemple par précipitation par addition de chlorure de sodium, puis de méthanol.
- 25 Les esters d'héparine utilisés comme produits de départ pour la préparation des mélanges de polysaccharides selon l'invention peuvent être des esters non sélectifs ou sélectifs. Par esters non sélectifs on entend dans le cadre de la présente invention des esters d'héparine dans lesquels sont estérifiés indifféremment les groupes carboxyliques des
- 30 chaînons acide D-glucuronique, acide L-iduronique non sulfaté et acide L-iduronique sulfaté. Par esters sélectifs on entend dans le cadre de la présente invention des esters d'héparine dans lesquels sont estérifiés, partiellement ou totalement, soit uniquement les groupes carboxyliques des chaînons acide D-glucuronique, soit uniquement les groupes
- 35 carboxyliques des chaînons acide D-glucuronique et acide L-iduronique non sulfaté, soit encore uniquement les groupes carboxyliques des

0040144

- 11 -

5 dans le premier cas et à une valeur comprise dans l'intervalle 2-3 dans le deuxième cas. Comme alcool de formule (III) utilisable on peut citer en particulier le méthanol et l'éthanol, auquel cas on obtient respectivement des esters d'héparine sélectifs méthylique et éthylique.

Les procédés selon l'invention utilisant l'action d'une base minérale ou organique sur un ester d'héparine, qui sont des procédés par β -élimination, permettent de réaliser une dépolymérisation partielle et contrôlée de l'héparine sans altérer sa structure générale.

- 10 Les mélanges de polysaccharides sulfatés selon l'invention possèdent des activités anticoagulante et antithrombotique et une activité hypolipémiante. Pour les mélanges de poids moléculaire moyen suffisamment faible (en pratique inférieur ou égal à 7 000 daltons), l'activité antithrombotique est supérieure à l'activité anticoagulante. Les mélanges selon l'invention sont peu toxiques. A titre d'exemple, le produit
- 15 de l'exemple 9 est atoxique à la dose de 300 mg/kg chez le rat et la souris, lorsqu'il est administré par la voie intra-veineuse, et présente une toxicité identique à celle de l'héparine, lorsqu'il est administré par la voie sous-cutanée.
- 20 Les mélanges de polysaccharides sulfatés selon l'invention dans lesquels les groupes acides des polysaccharides sont sous forme de sels pharmaceutiquement acceptables, en particulier sous forme de sel de sodium, de calcium ou de magnésium, sont utilisables, en tant qu'agents anticoagulants et antithrombotiques, pour la prévention et le traitement
- 25 des thromboses. Ils sont également utilisables pour le traitement de l'hyperlipémie. Ils peuvent être avantageusement substitués à l'héparine pour de telles applications. En effet, administrés par voie sous-cutanée, ils présentent une plus longue durée d'action que l'héparine, ce qui permet de diminuer la fréquence des injections. D'autre
- 30 part, ils provoquent moins d'effets secondaires (effets hémorragiques) que l'héparine.

Ils peuvent être administrés, en mélange avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable, par voie intraveineuse, par voie sous-cutanée, par voie pulmonaire (inhalation), par voie rectale, et, pour les

0040144

- 15 -

isole 3,84 g d'ester chloro-4 benzylique d'héparine, sous forme de sel de sodium.

On traite 2 g de l'ester ci-dessus par 50 ml d'une solution aqueuse 0,1N d'hydroxyde de sodium à 60°C, sous agitation, pendant deux heures.

- 5 Après refroidissement et neutralisation par une solution aqueuse 0,1N d'acide chlorhydrique, on précipite par addition de deux volumes de méthanol. On isole le précipité par filtration, le lave au méthanol et le sèche sous vide. On obtient ainsi 1,38 g d'héparine dépolymérisée, sous forme de sel de sodium.

10 EXEMPLE 6

A une solution de 5 g d'héparinate de benzéthonium dans 125 ml de dichlorométhane on ajoute 5 g de chlorure de (nitro-4)benzyle, que l'on dissout par agitation. La solution est ensuite abandonnée pendant 3 jours à la température ambiante, puis on évapore le solvant sous vide et dissout le résidu dans 75 ml de diméthylformamide. On précipite l'ester formé par addition de 75 ml de solution à 10 % d'acétate de sodium dans le méthanol. Le précipité est recueilli par filtration, lavé au méthanol et séché sous vide. On obtient ainsi 1,89 g d'ester nitro-4 benzylique d'héparine, sous forme de sel de sodium.

- 20 On traite 1,85 g de l'ester ci-dessus par 46 ml d'une solution aqueuse 0,1N d'hydroxyde de sodium à 60°C, pendant deux heures, sous agitation. Après refroidissement, on neutralise par addition d'une solution aqueuse 0,1N d'acide chlorhydrique, puis précipite par addition de deux volumes de méthanol. Le précipité est isolé par filtration, lavé au méthanol et séché sous vide. On obtient ainsi 1,13 g d'héparine dépolymérisée, sous forme de sel de sodium.
- 25

EXEMPLE 7

A une solution de 30 g d'héparinate de benzéthonium dans 500 ml de dichlorométhane on ajoute 30 g de chlorure de benzyle, que l'on dissout par agitation. La solution est ensuite abandonnée à température ambiante pendant 24 heures, puis on évapore le solvant sous vide et reprend le résidu par 400 ml d'éther. L'insoluble est séparé par filtration.

- 30 On obtient ainsi 30 g d'ester benzylique d'héparine, sous forme de sel de benzéthonium. Cet ester est dissous dans 200 ml de dichlorométhane

0040144

- 16 -

contenant 8 ml de diaza-1,5 bicyclo [4.3.0.] nonène-5. On porte à reflux pendant 3h30, puis évapore le solvant sous vide. Le résidu est dissous dans 450 ml de diméthylformamide et on ajoute un égal volume d'une solution à 10 % d'acétate de sodium dans le méthanol. Le précipité est
5 recueilli par filtration et lavé au méthanol. Puis on le traite à 0°C pendant une heure par une solution aqueuse 1N d'hydroxyde de sodium. Après neutralisation, on précipite par addition de deux volumes de méthanol. Le précipité est isolé par filtration, lavé au méthanol et séché sous vide.

10 On obtient 6,6 g d'héparine dépolymérisée, sous forme de sel de sodium.

EXEMPLE 8

A une solution de 10 g d'héparinate de benzéthonium dans 250 ml de dichlorométhane on ajoute 10 g de chlorure de (chloro-4)benzyle, que l'on dissout par agitation. La solution est abandonnée à température ambiante pendant 24 heures, puis on évapore le solvant sous vide. On reprend
15 le résidu par 200 ml d'éther et isole par filtration le précipité formé. On obtient ainsi 10 g d'ester chloro-4 benzylique d'héparine, sous forme de sel de benzéthonium.

On dissout 5 g de ce produit dans 100 ml de dichlorométhane contenant
20 1,5 ml de diaza-1,5 bicyclo [4.3.0.] nonène-5 et porte à reflux pendant 4 heures. Puis on évapore le solvant sous vide, reprend le résidu par 30 ml de diméthylformamide et ajoute 100 ml d'une solution à 10 % d'acétate de sodium dans le méthanol. Le précipité formé est isolé par filtration, lavé au méthanol, puis traité par 24 ml d'une solution
25 aqueuse 1N d'hydroxyde de sodium pendant une heure à 0°C. On neutralise par addition d'une solution aqueuse 1N d'acide chlorhydrique et précipite par addition de deux volumes de méthanol. On sépare le précipité par filtration. Après lavage au méthanol et séchage sous vide, on obtient 1 g d'héparine dépolymérisée, sous forme de sel de sodium.

EXEMPLE 9

30 A une solution de 30 g d'héparinate de benzéthonium dans 600 ml de diméthylformamide on ajoute 30 g de chlorure de benzyle. Après dissolution, on laisse en contact pendant 60 heures à la température ambiante,

0027089

fraction (1)	Poids	:	15 mg
	Titre USP	:	156 UI/mg
	Titre YIN-WESSLER	:	190 U/mg

5 fraction (2)	Poids	:	16 mg
	Titre USP	:	139 UI/mg
	Titre YIN-WESSLER	:	520 U/mg

fraction (3) 10	Poids	:	17 mg
	Titre USP	:	50,3 UI/mg
	Titre YIN-WESSLER	:	1 390 U/mg

fraction (4) 15	Poids	:	40 mg
	Titre USP	:	7 UI/mg
	Titre YIN-WESSLER	:	870 U/mg

fraction (5) 20	Poids	:	1 mg
	Titre USP	:	nul
	Titre YIN-WESSLER	:	150 U/mg

On étudie les domaines de poids moléculaire des fractions ainsi obtenues, en particulier de la "fraction 4" et de la "fraction 5", à la fois par chromatographie sur papier et par Chromatographie Liquide sous Haute Pression 25 (HPLC) et on effectue une étude comparative en considérant les résultats obtenus selon les mêmes conditions expérimentales avec un decasaccharide d'héparine et :

- par chromatographie sur papier, avec les produits de référence décrits dans l'article de SILVA et 30DIETRICH (SILVA M. E. et DIETRICH C. P. , J. Biol. chem. Vol. 250 (1975) p. 6 841 - 6 846), et

- par HPLC sur gel de silice, avec une série de polystyrene-sodium sulfonates ayant des poids moléculaires connus allant en augmentant et des échantillons d'héparine 35 de poids moléculaires connus.

la "fraction 4" apparaît constituée par un oligosaccharide possédant moins de 8 motifs saccharidiques et probablement pas plus de 6 motifs saccharidiques, et la "fraction 5" d'un oligosaccharide possédant moins de 6 mo-

0040144

- 27 -

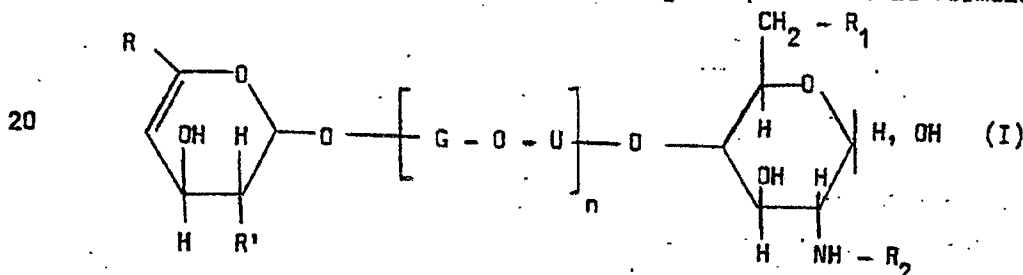
Revendications de brevet

1. Mélanges de polysaccharides sulfatés ayant la structure générale des polysaccharides constitutifs de l'héparine et dont les groupes acides sont sous forme libre ou salifiée, caractérisés en ce que les polysaccharides constitutifs desdits mélanges possèdent une double liaison éthylénique à l'une des extrémités de leur chaîne et en ce que les mélanges présentent, à l'état de sel de sodium, les caractéristiques suivantes :

- pourcentage de soufre : 9 % à 13,5 %
- pourcentage d'azote : 1,8 % à 2,5 %
- pourcentage d'acides uroniques : 20 % à 30 %
- poids moléculaire moyen en poids : 2 000 à 10 000 daltons
- pouvoir rotatoire spécifique en solution aqueuse à 20°C :

$$\left[\alpha \right]_D^{20} : + 25^\circ \text{ à } +55^\circ$$

2. Mélanges selon la revendication 1, caractérisés en ce que les polysaccharides constitutifs desdits mélanges répondent à la formule :



dans laquelle R désigne un atome d'hydrogène ou un groupe carboxylique, sous forme acide ou sous forme salifiée, R' désigne un groupe OH ou un groupe sulfate, sous forme acide ou sous forme salifiée, R₁ désigne un groupe OH ou un groupe sulfate, sous forme acide ou sous forme salifiée, R₂ désigne un groupe sulfonate, sous forme acide ou sous forme salifiée, ou un groupe acétyle, -O- désigne un pont oxygène, les chaînons G désignent les chaînons du type glucosamine figurant dans la structure de l'héparine, les chaînons U désignent les chaînons du type acide uronique (acide D-glucuronique, acide L-iduronique, acide L-iduronique sulfaté) figurant dans la structure de l'héparine, et n est un nombre entier de 3 à 20, les groupes acides des polysaccharides étant sous forme libre ou sous forme salifiée.

0040144

- 28 -

3. Mélanges selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisés en ce qu'ils présentent, à l'état de sel de sodium, les caractéristiques suivantes :

- 5
- poids moléculaire moyen en poids : 8 000 à 10 000 daltons
 - activité anticoagulante in vitro Codex : 130 à 160 u.i./mg
 - activité in vitro anti-Xa : 130 à 180 u.i./mg
 - activité in vitro A.P.T.T. : 100 à 150 u.i./mg
 - rapport $\frac{\text{activité in vitro anti-Xa}}{\text{activité in vitro A.P.T.T.}}$: 1 à 1,5

10 4. Mélanges selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisés en ce qu'ils présentent, à l'état de sel de sodium, les caractéristiques suivantes :

- 15
- poids moléculaire moyen en poids : 3 000 à 8 000 daltons
 - activité anticoagulante in vitro Codex : 80 à 140 u.i./mg
 - activité in vitro anti-Xa : 120 à 250 u.i./mg
 - activité in vitro A.P.T.T. : 80 à 120 u.i./mg
 - rapport $\frac{\text{activité in vitro anti-Xa}}{\text{activité in vitro A.P.T.T.}}$: 1,4 à 3

20 5. Mélanges selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisés en ce qu'ils présentent, à l'état de sel de sodium, les caractéristiques suivantes :

- 25
- poids moléculaire moyen en poids : 2 000 à 7 000 daltons
 - activité anticoagulante in vitro Codex : 10 à 80 u.i./mg
 - activité in vitro anti-Xa : 80 à 250 u.i./mg
 - activité in vitro A.P.T.T. : 10 à 80 u.i./mg
 - rapport $\frac{\text{activité in vitro anti-Xa}}{\text{activité in vitro A.P.T.T.}}$: 2 à 10

6. Mélange selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il présente, à l'état de sel de sodium, les caractéristiques suivantes :

19  **Europäisches Patentamt**
European Patent Office
Office européen des brevets

11 Numéro de publication: **0 027 089**
A1

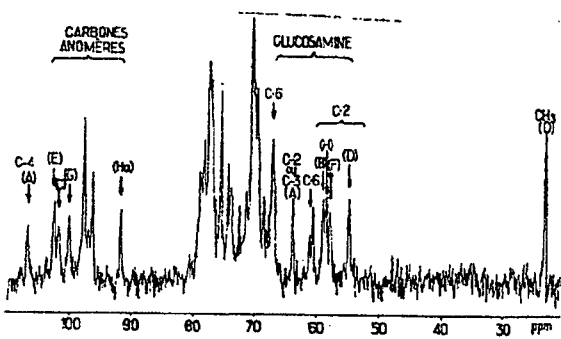
12 **DEMANDE DE BREVET EUROPEEN**

21 Numéro de dépôt: **80401425.6** 51 Int. Cl.³: **C 08 B 37/10, A 61 K 31/725**
22 Date de dépôt: **06.10.80**

30 Priorité: 05.10.79 GB 7934673 07.01.80 GB 8000443 02.07.80 GB 8021749 02.07.80 GB 8021750 15.09.80 GB 8029697	71 Demandeur: CHOAY S.A., 48, Avenue Théophile-Gautier, F-75782 Paris Cédex 16 (FR)
43 Date de publication de la demande: 15.04.81 Bulletin 81/15	72 Inventeur: Lormeau, Jean-Claude, 23-27 Plein Sud, F-76150 Maromme La Maine (FR) Inventeur: Choay, Jean, 130, Faubourg Saint-Honoré, F-75008 Paris (FR) Inventeur: Petitou, Maurice, Appt. 201 27, rue du Javelot, F-75645 Paris Cedex 13 (FR)
84 Etats contractants désignés: AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE	74 Mandataire: Peaucells, Chantal et al, Cabinet Plasseraud 84, rue d'Amsterdam, F-75009 Paris (FR)

54 **Fractions oligosaccharidiques et oligosaccharides possédant des propriétés biologiques, leurs procédés de préparation et leurs applications en tant que médicaments.**

57 Oligosaccharides pouvant être obtenus à partir d'héparine comportant des constituants hépariniques de poids moléculaire de 2000 à 50 000. Ces oligosaccharides possèdent une affinité élevée pour l'AT III et un titre Yin-Wessler élevé. Le rapport de leur titre Yin-Wessler à leur titre USP est d'au moins 30. Ils sont constitués de chaînes saccharidiques ne renfermant pas plus de huit motifs saccharadiques. Ils possèdent un signal caractéristique dans la région C-2 de résidu N-sulfate-glucosamine. Ils sont doués d'activité antithrombotique et sont donc utilisables comme médicaments antithrombotiques.



EP 0 027 089 A1

Fractions oligosaccharidiques et oligosaccharides possédant des propriétés biologiques, leurs procédés de préparation et leurs applications en tant que médicaments.

L'invention est relative à des fractions oligosaccharidiques et à des oligosaccharides possédant des propriétés biologiques leur permettant notamment de contrôler, de manière spécifique, certaines étapes
5 de la coagulation sanguine.

Elle concerne également leurs procédés d'obtention et leurs applications en tant que principes actifs de médicaments.

L'invention est plus particulièrement relative
10 à des oligosaccharides (et aux fractions oligosaccharidiques qui les contiennent) possédant une activité hautement sélective vis-à-vis du facteur X activé ou facteur Xa du sang, à savoir une activité antithrombotique puissante, sans entraîner de risques
15 hémorragiques pour le patient. Le terme "fraction oligosaccharidique" est utilisé dans la description et les revendications pour désigner un mélange relativement homogène de fragments ou chaînes d'oligosaccharides constitués par un nombre variable de
20 motifs saccharidiques.

Les travaux effectués par les inventeurs dans ce domaine les ont amenés à considérer les fractions oligosaccharidiques biologiquement actives, et les oligosaccharides eux-mêmes, tels qu'obtenus à partir
25 de l'héparine.

On notera que le terme héparine est utilisé dans la description et les revendications dans son sens le plus large, pour désigner indifféremment une
préparation d'héparine commerciale de qualité pharmaceutique ou une héparine brute telle qu'obtenue par
30 extraction à partir de matériaux biologiques, en particulier de tissus de mammifères.

Il est admis que l'héparine est un polysaccharide hétérogène aussi bien au regard de la composition

des chaînes oligosaccharidiques qu'elle comporte que du poids moléculaire de ces chaînes.

Il est également considéré qu'elle renferme principalement ^{ses motifs} des motifs ^{que continue} d'acide 2 - O sulfate -

- 5 L - iduronique et de N-sulfate - D-glucosamine (6-O-sulfatée ou non) et, dans une moindre mesure, des motifs d'acide D-glucuronique, d'acide L-iduronique et de N-acétyl-D-glucosamine (6-O-sulfatée ou non).

- 10 On sait, en outre que l'héparine exerce son activité anticoagulante en potentialisant l'effet inhibiteur de l'antithrombine III (AT III), qui est une protéine du plasma, vis-à-vis des cascades de réactions enzymatiques mises en jeu au cours de la coagulation.

- 15 Etant donné que l'héparine est capable de déprimer simultanément un grand nombre de facteurs de la coagulation intervenant dans la création et le maintien des différentes formes d'hypercoagulabilité, son activité n'apparaît pas spécifique mais globale.

- 20 Si cette activité anticoagulante s'avère précieuse, elle rend toutefois délicat le rééquilibrage du système coagulation-fibrinolyse chez les patients en traitement et ce, en raison du caractère global de son action. Il s'ensuit que l'administration (dans le but de prévenir les risques d'hypercoagulation, par exemple l'apparition
- 25 de thromboses postchirurgicales), de doses trop élevées de médicament anticoagulant, ou l'insuffisante sélectivité de ce médicament, peut finalement être à l'origine d'hémorragies graves.

- 30 L'étude approfondie de conditions variées de dépolymérisation de l'héparine et des mélanges de dépolymérisation résultants a amené les inventeurs à constater qu'il est possible, en opérant dans certaines conditions, d'obtenir des mélanges renfermant des oligosaccharides possédant de précieuses propriétés anti-
- 35 thrombotiques. Ces oligosaccharides sont plus satisfaisant que l'héparine en ce qui concerne la spécificité de leur activité. Ils sont plus particulièrement

rement capables d'augmenter l'activité spécifique de l'AT III vis-à-vis d'un nombre plus réduit de facteurs de la coagulation, plus spécialement vis-à-vis du facteur Xa^{IIa} du sang. Plus spécialement, les inventeurs ont
5 constaté que de telles fractions et oligosaccharides possèdent une faible activité anticoagulante globale telle que, mesurée selon la méthode USP. En conséquence, il apparaît que le rapport de leur activité anti-Xa, exprimée en unités Yin-Wessler et de leur
10 titre USP est élevé; il est en effet au moins égal à 30.

On rappelle que l'activité Yin-Wessler est plus spécialement représentative de l'aptitude des fractions actives à potentialiser l'inhibition du facteur Xa du sang par l'AT III dans le test correspondant
15 et le titre USP du pouvoir des fractions actives à inhiber la coagulation totale du sang ou du plasma.

Le titre Yin-Wessler est mesuré selon la méthode décrite par ces auteurs dans J. Lab. Clin. Med . .
1976, -81; 298 à 300 et le titre U.S.P. selon la
20 méthode décrite dans "Pharmacopea of the United States of America", pages 229 et 230 (voir également le deuxième supplément U.S.P.-NF, page 62 et le quatrième supplément U.S.P., page 90, intitulé respectivement "Drug substances" et "Dosage Forms").

25 D'une manière inattendue, il est ainsi apparu que cette activité spécifique anti-Xa souhaitée se retrouvait dans les chaînes oligosaccharidiques courtes, à savoir celles ne renfermant pas plus de 8 motifs, pouvant être isolées des mélanges de dépolymérisation en ayant recours à certaines opérations
30 de purification réalisées dans des conditions déterminées.

On notera que le terme "motif saccharidique" tel qu'utilisé dans la description et les revendications désigne les monosaccharides contenus dans les
35 chaînes de l'héparine.

En outre, selon un aspect de grand intérêt,

l'étude de ces fractions et oligosaccharides par les inventeurs a montré que cette activité anti-Xa, telle que mesurée par le test Yin-Wessler, était significative d'une activité antithrombotique *in vivo*.

5 L'invention vise donc à fournir de nouveaux oligosaccharides et les fractions qui les ^{provoque} renferment, possédant une activité anti-Xa élevée et présentant à l'égard du facteur Xa une sélectivité remarquable dans le cadre des réactions enzymatiques successives
10 qui caractérisent le processus de coagulation.

Elle vise également à fournir des caractéristiques de structure de ces oligosaccharides.

Elle a également pour but de fournir un procédé d'obtention de ces fractions, de mise en oeuvre aisée.

15 L'invention a, en outre, pour but, de fournir des principes actifs de médicaments, et les médicaments eux-mêmes, capables notamment d'inhiber le facteur Xa selon un degré de sélectivité élevé alors que leur activité sur la coagulation globale peut être maintenue
20 à un niveau très faible. Ces médicaments sont avantageusement utilisables pour des traitements antithrombotiques sans entraîner de risques hémorragiques.

Les fractions évoquées ci-dessus sont du type de celles pouvant être obtenues par un procédé qui comprend
25 les étapes de :

- mise en contact de l'héparine (ou de fractions hépariniques) possédant une activité anticoagulante et ayant des chaînes de poids moléculaire d'environ 2.000 à environ 50000, avec un agent capable de
30 dépolymériser ou de fragmenter les chaînes hépariniques, les conditions utilisées pour réaliser cette étape étant ajustées de manière à obtenir un mélange de dépolymérisation contenant des fragments ou chaînes oligosaccharidiques constitués par 8 motifs
35 au plus, mais possédant cependant une activité anti-Xa (Yin-Wessler), et comprenant une séquence constituée de moins de 8 motifs, cette séquence

étant responsable dans une large mesure de l'activité spécifique anti-Xa des produits ;

- le traitement du mélange de dépolymérisation pour séparer au moins la majeure partie des chaînes oligosaccharidiques définies ci-dessus, ce traitement comprenant avantageusement, a) le contact du mélange de dépolymérisation avec de l'AT III pour séparer sélectivement au moins la majeure partie, avantageusement pratiquement la totalité des oligosaccharides possédant une séquence ayant une structure spécifique, nécessaire pour reconnaître l'AT III et se lier à cette dernière
- b) l'élimination des produits non désirés ;
- c) la récupération des produits désirés.

Lesdits oligosaccharides peuvent être caractérisés par le fait qu'ils possèdent une structure spécifique capable de se lier à l'AT III. Ils possèdent une activité anti-Xa supérieure à celle de l'héparine et une activité anticoagulante globale très faible.

Les produits possédant une affinité pour l'AT III, tels que récupérés à partir du procédé défini ci-dessus, sont soumis à une ou plusieurs étapes afin de séparer sélectivement les oligosaccharides à chaînes courtes définis ci-dessus.

Cette séparation est avantageusement obtenue par fractionnement du mélange des produits élués possédant une affinité pour l'AT III, selon leur poids moléculaire et/ou leur densité ionique, puis par récupération des fractions désirées.

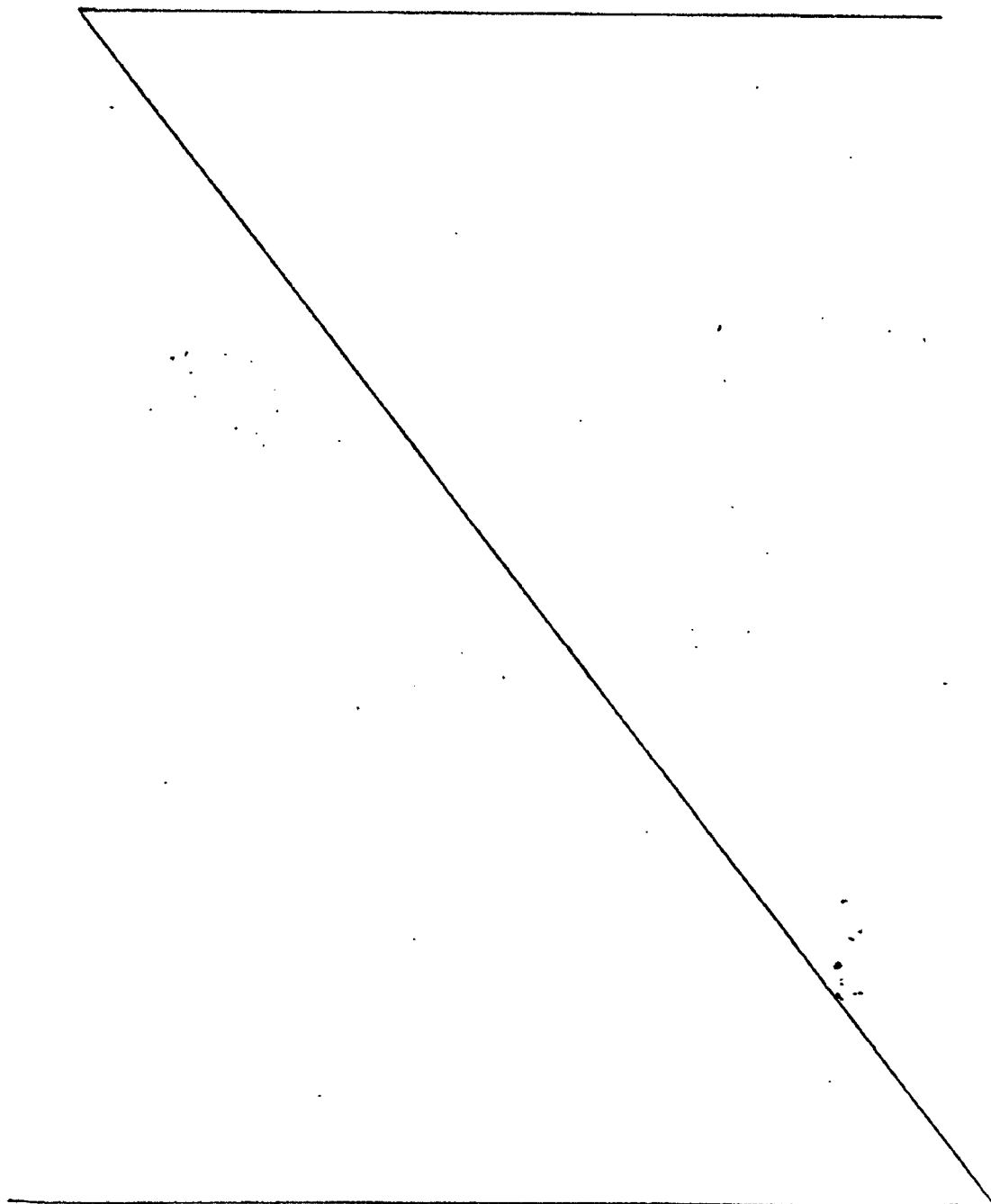
En variante, on peut réaliser le fractionnement directement sur le mélange de dépolymérisation. A ce stade, les fractions comprenant des chaînes oligosaccharidiques courtes, avantageusement les oligosaccharides per se, peuvent être isolés. Les fractions, le cas échéant les oligosaccharides, possédant une affinité élevée pour l'AT III, sont ensuite séparées en ayant recours à une étape comprenant la mise en contact de ces fractions avec de l'AT III comme indiqué ci-dessus.

des motifs N-sulfate-glucosamine et N-acétyl-glucosamine.

Certains oligosaccharides de l'invention apparaissent ainsi caractérisés par la présence d'un motif N-acétyl-D-glucosamine pour deux motifs N-sulfate-glucosamine.

- 5 D'autres oligosaccharides sont caractérisés par la présence d'un motif N-acétyl-D-glucosamine pour trois motifs N-sulfate-D-glucosamine.

10 { Un oligosaccharide de ce type est constitué par un octasaccharide correspondant à celui présentant la séquence suivante ABCDEFGH.



11

0027089

Dans cette formule, R représente un atome d'hydrogène ou un groupe sulfate SO_3^- .

Un autre octasaccharide possède la séquence ABGHCDEF.

- 5 Des hexasaccharides actifs de l'invention comprennent également des motifs parmi lesdits motifs A,B,C,E et H. L'un de ces hexasaccharides possède la séquence ABCDEF.

Un autre hexasaccharide possède la séquence

- 10 CDEFGH où C est un acide uronique insaturé.

Encore un autre hexasaccharide possède la séquence CDEFGH (où C est un résidu d'acide iduronique).

- D'autres oligosaccharides actifs sont des pentasaccharides, en particulier celui possédant la structure
15 DEFGH.

Des chaînes oligosaccharidiques plus courtes, encore biologiquement actives, font également partie de l'invention.

- L'invention vise également les sels pharmaceutiquement acceptables de ces oligosaccharides.
20

- L'invention vise également un procédé d'obtention des fractions et oligosaccharides évoqués ci-dessus, comportant la dépolymérisation de l'héparine et le traitement du mélange de dépolymérisation résultant afin d'en
25 séparer les fractions renfermant des oligosaccharides constitués au plus par huit motifs saccharidiques (avantageusement ces oligosaccharides eux-mêmes) possédant une affinité pour l'AT III, une activité anti-Xa (Yin-Wessler) élevée et un titre USP très faible.

- 30 L'étape de dépolymérisation est réalisée dans des conditions ménagées afin de ne pas dégrader complètement les chaînes oligosaccharidiques et à conserver les motifs responsables, dans une large mesure, de l'activité anti-Xa (Yin-Wessler).

- 35 De préférence, les conditions de dépolymérisation du procédé défini ci-dessus sont ajustées de manière à conserver le pouvoir d'au moins une partie des oligosaccharides résultants d'être retenus spécifiquement sur de l'AT III immobilisée.

fraction (1)	Poids	:	15 mg
	Titre USP	:	156 UI/mg
	Titre YIN-WESSLER	:	190 U/mg

5 fraction (2)	Poids	:	16 mg
	Titre USP	:	139 UI/mg
	Titre YIN-WESSLER	:	520 U/mg

fraction (3) 10	Poids	:	17 mg
	Titre USP	:	50,3 UI/mg
	Titre YIN-WESSLER	:	1 390 U/mg

*fraction (4) 15	Poids	:	40 mg
	Titre USP	:	7 UI/mg
	Titre YIN-WESSLER	:	870 U/mg

{ fraction (5) 20	Poids	:	1 mg
	Titre USP	:	nul
	Titre YIN-WESSLER	:	150 U/mg

On étudie les domaines de poids moléculaire des fractions ainsi obtenues, en particulier de la "fraction 4" et de la "fraction 5", à la fois par chromatographie sur papier et par Chromatographie Liquide sous Haute Pression 25 (HPLC) et on effectue une étude comparative en considérant les résultats obtenus selon les mêmes conditions expérimentales avec un decasaccharide d'héparine et :

- par chromatographie sur papier, avec les produits de référence décrits dans l'article de SILVA et 30DIETRICH (SILVA M. E. et DIETRICH C. P. , J. Biol. chem. Vol. 250 (1975) p. 6 841 - 6 846), et

- par HPLC sur gel de silice, avec une série de polystyrene-sodium sulfonates ayant des poids moléculaires connus allant en augmentant et des échantillons d'héparine 35 de poids moléculaires connus.

la "fraction 4" apparaît constituée par un oligosaccharide possédant moins de 8 motifs saccharidiques et probablement pas plus de 6 motifs saccharidiques, et la "fraction 5" d'un oligosaccharide possédant moins de 6 mo-

1.- Fractions oligosaccharidiques, possédant une activité anti-Xa (Yin-Wessler) du type de celles pouvant être obtenues par un procédé qui comprend les étapes de :

- 5 : - mise en contact de l'héparine (ou des fractions hépariniques) possédant une activité anti-coagulante et comportant des chaînes d'un poids moléculaire d'environ 2000 à 50 000, avec un agent capable de dépolymériser ou fragmenter les chaînes hépariniques, les conditions utilisées pour réaliser cette
10 étape étant ajustées ^{de manière} à obtenir un mélange de dépolymérisation qui contient des fragments ou chaînes oligosaccharidiques constitués par huit motifs au plus, possédant cependant une activité anti-Xa (Yin-Wessler) et comportant une séquence constituée
15 par moins de huit motifs, cette séquence étant responsable, dans une large mesure, de l'activité spécifique anti-Xa des produits ;
- le traitement du mélange de dépolymérisation afin de séparer au moins la majeure partie des chaînes
20 oligosaccharidiques définies ci-dessus, ce traitement comprenant avantageusement
 - a) le contact du mélange de dépolymérisation avec de l'ATIII pour adsorber ou retenir au moins la majeure partie, avantageusement pratiquement la totalité des oligosaccharides possédant une séquence
25 ayant une structure spécifique vis à vis de l'ATIII,
 - b) l'élimination des produits non désirés,
 - c) la récupération des produits désirés ; et les sels pharmaceutiquement acceptables de ces fractions.
- 30

2. - Fractions oligosaccharidiques selon la revendication 1, caractérisées par le fait que :
les produits possédant une affinité pour l'ATIII et une activité anti-Xa, tels que récupérés à partir du procédé mentionné ci-dessus, sont soumis à une ou plusieurs
35 étapes afin de séparer les oligosaccharides actifs à chaînes courtes définis ci-dessus, et avantageusement sont fractionnés par exemple par gel perméation selon

leur poids moléculaire et/ou leur densité ionique, les fractions désirées étant ensuite récupérées.

3.- Fractions oligosaccharidiques selon la revendication 1, caractérisées par le fait que dans ledit procédé le mélange de dépolymérisation est fractionné avant d'être mis en contact avec l'ATIII.

4. - Fractions oligosaccharidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisées par le fait que dans ledit procédé le matériau héparinique est dépolymérisé par voie chimique, en particulier avec de l'acide nitreux, HNO_2 , en milieux aqueux, ce qui entraîne la formation de chaînes saccharidiques courtes contenant à leur extrémité réductrice un groupe 2,5-anhydromannose, ou par voie enzymatique avantageusement avec une héparinase hautement purifiée, plus spécialement une héparinase d'origine bactérienne, ce qui entraîne la formation de chaînes saccharidiques courtes terminées à leur extrémité non réductrice par un acide uronique α - β insaturé.

5. - Oligosaccharides tels que ceux obtenus dans les fractions selon l'une quelconque des revendications 2 ou 3, ou leurs sels pharmaceutiquement acceptables, caractérisés par le fait qu'ils possèdent une affinité pour l'ATIII, une activité anti-Xa supérieure à celle de l'héparine et une activité anti-coagulante globale très faible, qu'ils ne sont pas constitués par plus de huit motifs saccharidiques et qu'ils comportent une séquence qui ne possède pas plus de huit motifs saccharidique et est responsable, dans une large mesure, de leur activité spécifique anti-Xa, cette séquence possédant une structure spécifique nécessaire pour reconnaître l'ATIII et se lier à l'ATIII.

6. - Fractions oligosaccharidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, et oligosaccharides selon la revendication 5, caractérisés par le fait qu'ils possèdent un titre Yin-Wessler et un titre USP qui sont dans un rapport d'au moins 30, de préférence d'au moins 100.

7. - Fractions oligosaccharidiques selon l'une quelconque des revendications 5 et 6 et oligosaccharides selon la revendication 5 ou 6 caractérisés par le fait qu'ils possèdent une activité anti-Xa dix fois supérieure à celle de 1'héparine, qui peut-être supérieure à 100 ui/mg, avantageusement supérieure à 700 ou même à 1000 ou 1200 et peut atteindre 2000 ui/mg ou plus.
8. - Oligosaccharides selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, caractérisés par le fait qu'ils contiennent un résidu N-sulfate-D-glucosamine avantageusement 3-O sulfaté (F).
9. - Oligosaccharides selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, caractérisés par le fait qu'ils contiennent un résidu N-acétyl-D-glucosamine (D) et/ou un résidu acide D-glucuronique (E) et/ou un résidu d'acide 2-O-sulfate-L-iduronique (G) et/ou un résidu N-sulfate-D-glucosamine (H).
- 10.- Oligosaccharides selon l'une quelconque des revendications 5 à 9, caractérisés par le fait qu'ils contiennent un motif acide 2-O-sulfate, 4,5-insaturé uronique (A) et/ou un motif N-sulfate D-glucosamine (B) et/ou un motif acide L-iduronique (C).
11. - Oligosaccharides selon l'une quelconque des revendications 5 à 10, caractérisés par le fait qu'ils contiennent un résidu N-sulfate-D-glucosamine à leur extrémité réductrice, ce résidu étant sulfaté ou non en positions 3 et/ou 6.
12. - Oligosaccharides selon l'une quelconque des revendications 5 à 11, contenant tous les résidus définis ci-dessus, caractérisés par la présence d'environ ^{de} une molécule/N-acétyl-glucosamine par chaîne oligosaccharidique et/ou un motif N-acétyl-D-glucosamine pour deux ou trois motifs N-sulfate-glucosamine.

0027089

