

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :

2 912 408

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national :

07 01053

⑤① Int Cl⁸ : **C 08 B 37/10** (2006.01), A 61 K 31/715, A 61 P 7/02,
9/10, 25/28, 7/04

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 14.02.07.

③① Priorité :

⑦① Demandeur(s) : *SANOFI AVENTIS Société anonyme*
— FR.

⑦② Inventeur(s) : HUBERT PHILIPPE, MOURIER
PIERRE et VISKOV CHRISTIAN.

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 15.08.08 Bulletin 08/33.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du*
présent fascicule

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) :

⑤④ HEPARINE COMPRENANT AU MOINS UNE LIAISON COVALENTE AVEC LA BIOTINE OU UN DERIVE DE LA
BIOTINE, LEUR PROCÉDE DE PREPARATION, LEUR UTILISATION.

⑤⑦ La présente invention concerne des héparines pré-
sentant au moins une liaison covalente avec la biotine ou un
dérivé de la biotine, leur procédé de préparation, leur utiliza-
tion, ainsi qu'un procédé mettant en oeuvre l'avidine ou la
streptavidine permettant de neutraliser ces héparines bioti-
nylées.

FR 2 912 408 - A1



HEPARINE COMPRENANT AU MOINS UNE LIAISON COVALENTE AVEC LA BIOTINE OU UN DERIVE DE LA BIOTINE, LEUR PROCEDE DE PREPARATION, LEUR UTILISATION

- 5 La présente invention concerne des héparines présentant au moins une liaison covalente avec la biotine ou un dérivé de la biotine, appelées des héparines biotinylées.

10 L'héparine est un mélange de mucopolysaccharides sulfatés d'origine animale, et d'un poids moléculaire voisine 15000 Daltons, utilisée notamment pour ses propriétés anticoagulantes et anti-thrombotiques. L'héparine catalyse, notamment via l'antithrombine III (AT III), l'inhibition de deux enzymes qui interviennent dans la cascade de la coagulation du sang, à savoir, le facteur Xa et le facteur IIa (ou thrombine).

- 15 L'héparine présente cependant des inconvénients qui limitent les conditions de son utilisation. En particulier, son activité anticoagulante importante (anti-facteur IIa) peut occasionner des hémorragies (Seminars in Thrombosis and Hemostasis, vol 5 sup. 3 (1999)).

20 Les héparines sont connues pour ces effets secondaires hémorragiques indésirables.

Dans le domaine du traitement de la thrombose avec les produits ci-dessus, on doit rétablir ou maintenir la fluidité du sang tout en évitant de provoquer une hémorragie.

- 25 Il est en effet bien connu que, pour une cause accidentelle quelconque, une hémorragie peut se déclencher chez un patient sous traitement. On peut également avoir besoin d'intervenir chirurgicalement chez un malade sous traitement anti-thrombotique. De plus, au cours de certains actes chirurgicaux, des anticoagulants peuvent être utilisés à forte dose de façon à empêcher la coagulation du sang, et il est nécessaire de les neutraliser à la fin de l'intervention.
- 30 Il est donc intéressant d'avoir des agents antithrombotiques neutralisables pour stopper l'activité anticoagulante à tout moment.

Des agents antithrombotiques neutralisables, tels que des polysaccharides de synthèse biotinylés, ont été décrits dans les demandes de brevet WO 02/24754 et WO 06/030104. Leur synthèse, comprenant notamment le greffage de la biotine ou

35 du dérivé de biotine réalisé sur des équivalents protégés des polysaccharides

mentionnés ci-dessus et non sur ces polysaccharides eux-mêmes, n'est pas applicable aux composés de la présente invention. Cette synthèse ne permet pas la biotinylation de l'ensemble des chaînes saccharidiques fonctionnalisables des héparines et n'induit pas une régio-sélectivité suffisante de la position du greffage de la biotine ou du dérivé de la biotine. Les héparines étant des mélanges de polysaccharides d'origine animale, il est préférable que la biotinylation soit effectuée sur des produits finis afin que leur activité biologique soit conservée et que la neutralisation des héparines biotinylées soit suffisante.

- 10 Trois approches de biotinylation de l'héparine ont été étudiées, réalisées sur une l'héparine porcine, par l'équipe de R. I.W. Osmond and Coll., *Analytical Biochemistry*, 31 (2002) 199-207. Une des approches procèdent au greffage de la biotine sur des fonctions non définies de l'héparine. En fait, la méthode décrite par R. I.W. Osmond and Coll. ne prend pas en compte la diversité structurelle des héparines, et leurs différents procédés d'obtention, qui peuvent nécessiter la régénération d'une fonction réactive avant biotinylation due à la dégradation en totalité ou en partie les zones de liaison potentielles. Les conditions opératoires telles que décrites dans cette publication pour la biotinylation spécifique de l'héparine porcine ne permettent pas l'obtention de façon complète et reproductible d'héparines biotinylées avec des caractéristiques attendues, comme un taux de biotinylation suffisant pour une bonne neutralisation et avec une bonne pureté.

La présente invention concerne de nouvelles héparines modifiées, en ce sens que au moins 80% des chaînes polysaccharidiques constitutives du mélange présentent une liaison covalente avec la biotine (acide hexahydro-2-oxo-1H-thiéo[3,4-d]imidazole-4-pentanoïque) ou avec un dérivé de la biotine. De manière surprenante, il apparaît que l'introduction de biotine ou d'un dérivé de la biotine ne modifie pas l'activité pharmacologique des héparines. En effet, les nouvelles héparines biotinylées, objet de l'invention, ont une activité anti-thrombotique comparable aux héparines natives, c'est à dire avant biotinylation.

Elles possèdent un avantage considérable par rapport aux héparines natives, elles peuvent être rapidement neutralisées par un antidote spécifique, en situation d'urgence. Cette antidote spécifique est l'avidine sous forme tétramérique ou monomérique ou la streptavidine de masses respectives égale à environ 66 000,

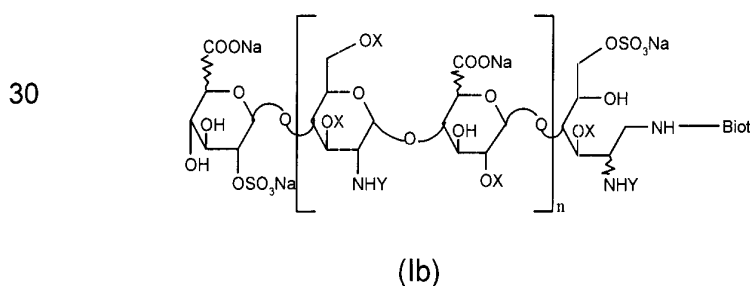
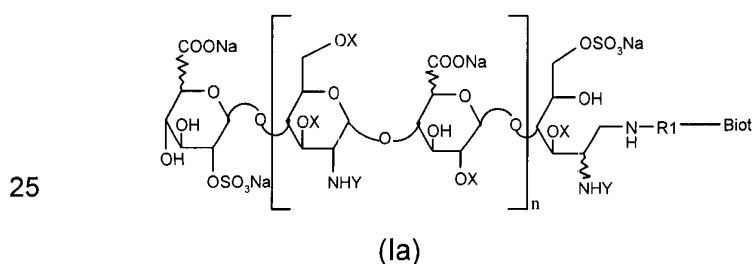
16 400, 60 000 Da (The Merck Index, Twelfth edition, 1996, M.N. 920, pages 151-152; Revue Pierce Avidin-Biotin Handbook).

Elles possèdent également l'avantage de pouvoir être utilisées à des doses plus élevées en diminuant le risque hémorragique et ainsi être utiles en thérapeutique dans le domaine artériel.

D'une manière générale, l'invention concerne des héparines à activité anti-thrombotique dont au moins 80% des chaînes polysaccharidiques constitutives du mélange présentent une liaison covalente avec la biotine ou un dérivé de biotine. Lesdites héparines dont les chaînes polysaccharidiques constitutives du mélange présentant une liaison covalente avec la biotine ou un dérivé de biotine sont également appelées ci-dessous héparines biotinylées.

Les héparines natives, c'est à dire les héparines de bas poids moléculaires de départ avant la biotinylation, sont dénommées ci-après "héparines".

La présente invention a pour objet des héparines biotinylées, caractérisées en ce que les polysaccharides constitutifs desdites héparines possèdent à leur extrémité réductrice une liaison covalente avec un groupe -Biot ou -R1-Biot, et répondent à la structure générale de formules (Ia) ou (Ib) telles que définies ci-dessous:



35 avec

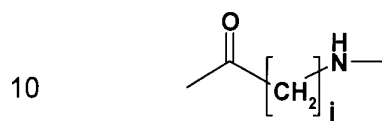
n ayant pour valeur moyenne de l'ordre de 25, pour une masse moléculaire moyenne de 15000 Da,

X représentant H ou SO_3Na ,

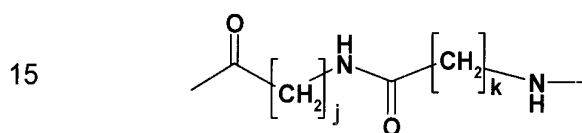
Y représentant COCH_3 ou SO_3Na ,

- 5 le trait ondulé désigne une liaison située soit au-dessous soit au-dessus du plan du cycle pyranosique,

- R_1 représentant un des enchaînements choisis parmi :

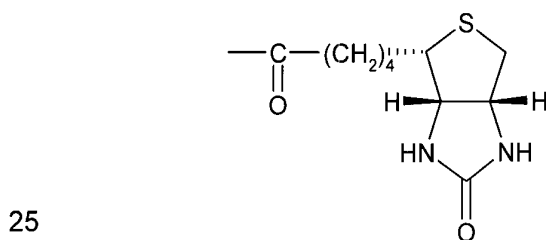


ou



dans lesquels j et k, identiques ou différents, sont des entiers pouvant prendre toute valeur de 1 à 10 ;

- 20 - Biot représentant le groupe biotine de formule:



ainsi que leurs sels pharmaceutiquement acceptables.

Les dérivés de biotine sont disponibles commercialement (catalogue "Pierce"

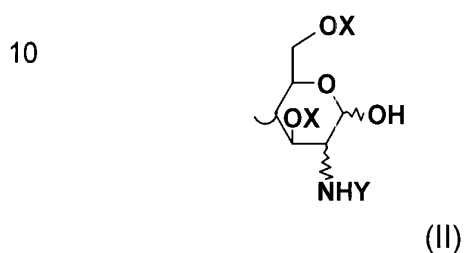
- 30 Biotin-avidin products, 2005, pp. 7-11), ou peuvent être préparés en utilisant des méthodes classiques connues de l'homme de l'Art.

L'héparine est un mélange de mucopolysaccharides sulfatés d'origine animale. Les héparines de la présente invention peuvent être notamment d'origine bovine,

- 35 ovine, ou porcine et plus précisément peuvent être issues de poumons de bœufs,

de muqueuses intestinales de bœuf, de muqueuses intestinales de porc, ou muqueuses intestinales de mouton.

Dans le cadre de la présente invention, on entend par extrémité réductrice:
 5 l'extrémité de la chaîne polysaccharidique avec une glucosamine ou mannosamine terminale possédant une fonction hémi-acétal cyclique (la mannosamine résulte d'une épimérisation en milieu basique de la glucosamine), répondant à la formule ci-dessous:



15

avec,

X représentant H ou SO_3Na ,

et Y représentant COCH_3 ou SO_3Na ,

le trait ondulé désigne une liaison située soit au-dessous soit au-dessus du plan du
 20 cycle pyranosique (au dessous: glucosamine, au dessus: mannaosamine).

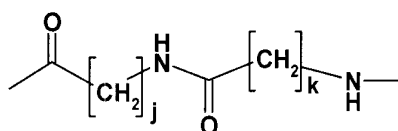
On entend par polysaccharides constitutifs de l'héparine un mélange de polysaccharides caractérisé par la répétition d'un motif disaccharidique contenant un résidu d'acide uronique (acide D-glucuronique ou acide L-iduronique) et d'une
 25 D-glucosamine qui peut-être N-sulfatée ou N-acétylée. L'unité disaccharidique peut-être également O-sulfatée en positions C6 et / ou C3 de la D-glucosamine et en C2 de l'acide uronique (Heparin-binding proteins, H.Edward Conrad, 1998, p1).

Selon un aspect particulier, l'invention concerne des héparines biotinylées,
 30 caractérisées en ce que au moins 80% des polysaccharides constitutifs desdites héparines possèdent à leur extrémité réductrice une liaison covalente avec un groupe -Biot ou -R1-Biot, et répondent à la structure générale de formules (Ia) ou (Ib) telles que définies plus haut.

35

Selon un aspect particulier, l'invention concerne des héparines biotinylées mentionnées plus haut, dans lesquelles R₁ représente un enchaînement,

5



dans lequel j et k sont identiques et ont pour valeur 5.

10

Selon un aspect particulier, l'invention concerne des héparines biotinylées mentionnées plus haut, caractérisées en ce qu'elles sont d'origine porcine, et plus particulièrement issues de muqueuses intestinales de porc.

15 L'invention englobe les héparines biotinylées sous la forme de l'un quelconque de leurs sels pharmaceutiquement acceptables.

L'invention concerne également un procédé de préparation d'héparines à activité anticoagulante et anti-thrombotique dont au moins 80% des chaînes
20 polysaccharidiques constitutives du mélange présentent une liaison covalente avec la biotine ou un dérivé de la biotine, et ce quelle que soit la structure originelle de l'héparine.

La présente invention concerne un procédé pour la préparation des héparines
25 biotinylées mentionnées plus haut caractérisées en ce que :

- on traite l'héparine avec l'héparinase 3,
- puis on effectue une amination réductrice sur le produit précédemment obtenu en présence d'un sel d'amine et d'un agent réducteur à une température comprise entre 20 et 80°C,
- 30 - enfin on effectue une acylation avec un groupe -Biot ou -R1-Biot activé en présence d'une base en milieu aqueux,
- lesdites étapes du procédé de préparation pouvant être contrôlées par un suivi analytique HPLC type SAX, après dépolymérisation de ladite héparine en présence d'un mélange d'héparinase 1, 2 et 3.

35

La présente invention concerne plus particulièrement un procédé de préparation des héparines biotinylées mentionnées plus haut caractérisé en ce que :

- on traite l'héparine avec l'héparinase 3,
- on effectue une amination réductrice en présence d'un sel d'halogénure d'ammonium et d'un sel de borohydrure à une température comprise entre 50 et 80°C sur le produit précédemment obtenu,
- puis on effectue une acylation avec un dérivé biotinylé sous forme d'ester activé en présence d'une base en milieu aqueux.
- lesdites étapes du procédé de préparation pouvant être contrôlées par un suivi analytique HPLC type SAX, après dépolymérisation de ladite héparine en présence d'un mélange d'héparinase 1, 2 et 3.

On vérifie notamment après l'étape d'amination réductrice qu'au moins 80% des polysaccharides constitutifs desdites héparines portent à leur extrémité réductrice une fonction -NH₂.

On vérifie notamment après l'étape d'acylation qu'au moins 80% desdits polysaccharides amino-réduits portant une fonction -NH₂ sont biotinylés.

Dans son principe le procédé de préparation des composés selon l'invention utilise des héparines préparées comme précédemment rapporté dans la littérature. On se réfèrera notamment à l'ouvrage 'L'héparine, fabrication, structure, propriétés, analyses', J-P Duclos, Masson 1984.

L'Héparine peut être notamment préparée selon le procédé décrit dans le brevet US2005215519.

On entend par :

Héparinase 1 : l'enzyme héparine lyase I (EC 4.2.2.7) de *Flavobacterium heparinum*.

Héparinase 2 : l'enzyme héparine lyase II de *Flavobacterium heparinum*.

Héparinase 3: l'enzyme héparine lyase III (EC 4.2.2.8) de *Flavobacterium heparinum*.

Le suivi desdites étapes du procédé de préparation par HPLC type SAX et plus particulièrement CTA-SAX est effectué en utilisant par exemple la méthode décrite dans le brevet US2005/0186679.

Lesdits sels d'amine utilisés lors de la réaction d'amination réductrice telle que définie plus haut peuvent être des sels d'amines quaternaires, plus préférentiellement des sels d'halogénures d'ammonium (NH_4Z), Z représentant un

5 halogène tel que notamment chlore, fluor, brome ou iode.

Lesdits agents réducteurs utilisés lors de la réaction d'amination réductrice telle que définie plus haut peuvent être des sels de borohydrure, et plus préférentiellement des sels de cyanobohydrure.

Ladite base utilisée lors de la réaction d'acylation telle que définie plus haut peut

10 être à titre d'exemple un sel d'hydrogénocarbonate, ou de carbonate préférentiellement sous forme de sel de sodium, ou de potassium. Elle peut être également remplacée par toute autre base organique hydrosoluble connue de l'homme de l'art.

15 Les dérivés R_1 -Biot tels que définis plus haut peuvent être mis en jeu dans la réaction d'acylation directement sous forme d'esters activés, préformé ou généré in-situ en utilisant des conditions de couplage classiques de couplage connues de l'homme de l'art.

Le procédé décrit utilisent plus particulièrement des esters activés sous forme de

20 dérivés N-hydroxy succinimide et encore plus particulièrement des dérivés 3-sulfo N-hydroxy succinimide.

Le procédé de préparation selon la présente invention des héparines biotinylées

25 mentionnées plus haut, dans lesquelles lesdites chaînes polysaccharidiques comprennent une liaison covalente avec un groupe $-\text{R}_1$ -Biot tel que défini plus haut, est décrit dans le schéma suivant:

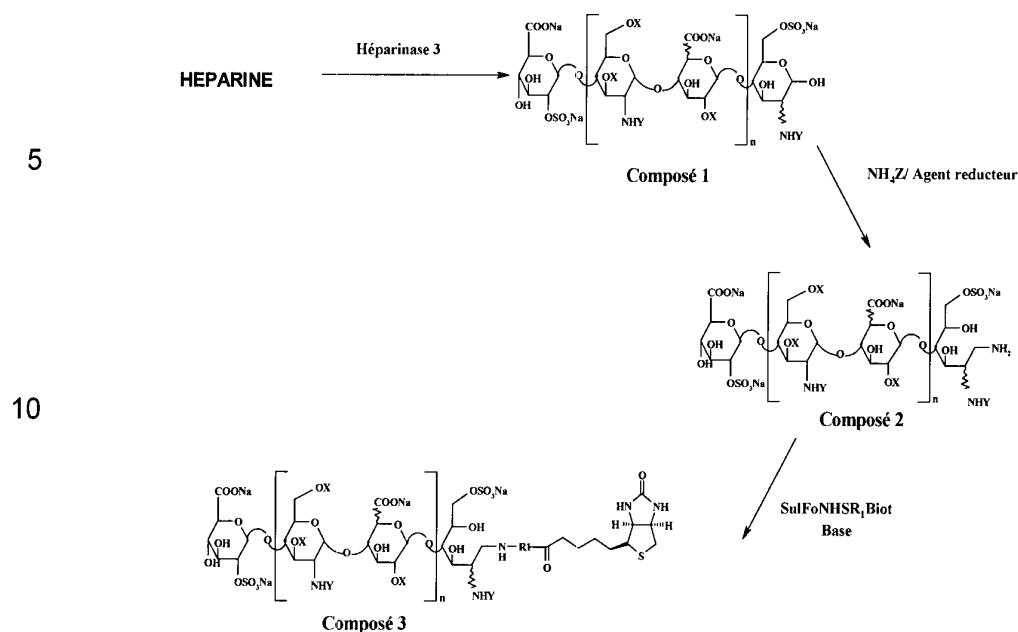
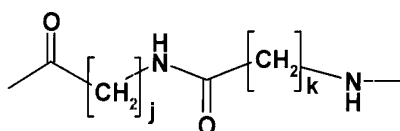


schéma 1

20 L'héparine est traitée par l'héparinase 3 pour éliminer la liaison protéique restante et obtenir un composé (1) comportant une extrémité réductrice exempte de résidu de glycosérine. Cette héparine (composé 1) peut alors être soumise à une amination réductrice pour fournir le dérivé composé (2) présentant une fonction-amino libre en position réductrice, en présence d'un sel d'amine et d'un agent réducteur tel qu'un sel de borohydrure. Ce dérivé peut alors être acylé pour fournir

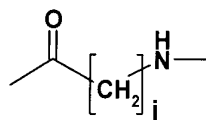
25 le composé biotinylé (3) par réaction avec un dérivé activé de biotine R₁-Biot. Cette réaction s'effectue notamment avec l'ester de 6-biotinamidohexanoyl hexanoate de 3-sulfosuccinimidyl, sel de sodium en présence de base lorsque R₁ représente l'enchaînement suivant:

30



dans lequel j et k ont chacun pour valeur 5. Elle s'effectue notamment avec le 6-biotinamido hexanoate de 3-sulfosuccinimidyl, sel de sodium sodium en présence de base, lorsque R_1 représente l'enchaînement suivant:

5



dans lequel j a pour valeur 5.

10

La préparation définie dans le schéma 1 peut être généralisée auxdits polysaccharides comprennent une liaison covalente avec un groupe -Biot tel que défini plus haut; l'acylation s'effectuant notamment par réaction avec l'ester de biotinoyl-sulfosuccinimidyl sel de sodium.

15

Dans ce qui suit, des exemples de synthèse des composés selon l'invention, et différents intermédiaires utiles à leur obtention, sont détaillés à titre d'illustration.

Les abréviations suivantes sont utilisées :

20 Héparines EPB : Héparine commercialisée par la société Bioibérica.

SAX : est le sigle anglais Strong anion exchange chromatography ;

CTA : est le sigle anglais pour cetyl trimethyl ammonium;

Q.S.P. : Quantité Suffisante Pour ;

HPLC ; est le sigle anglais pour Hight Pressure Liquid Chromatography ;

25 LC : est le sigle pour Long Chain est correspond à l'enchainement chimique 6-amino-hexanoyl ;

Sulfo-NHS : sel de sodium de l'ester 3-sulfo-succinimidyl.

Héparinase 1 : l'enzyme héparine lyase I (EC 4.2.2.7) de Flavobacterium heparinum.

30 Héparinase 2 : l'enzyme héparine lyase II de Flavobacterium heparinum.

Héparinase 3: l'enzyme héparine lyase III (EC 4.2.2.8) de Flavobacterium heparinum.

35 Exemple 1

1.1 Héparine EPB purifiée par dépolymérisation avec l'héparinase 3 :

A une température proche de 20°C, 1 g d'héparine brute EPB sont mis en solution dans 15 ml de la solution aqueuse de 5 mM de phosphate de sodium ajustée à pH
 5 $= 7,0 \pm 0,1$, 20 mM de chlorure de sodium et 1mg / ml de BSA. 0,5 UI d'héparinase 3 sont ajoutés à la solution d'héparine. Le mélange réactionnel obtenu est agité pendant 5 jours. 1 g de chlorure de sodium et 45 ml de méthanol sont ajoutés au mélange réactionnel. La suspension obtenue est filtrée sur membrane 0,45 μm . Le gâteau est lavé au méthanol, à l'éther diéthylique, puis séché sous vide. On obtient
 10 0,98 g d'un solide blanc.
 Le rendement observé est de 98 %.

Le produit peut être contrôlé par dépolymérisation à l'aide d'un mélange d'héparinase 1 + 2 + 3 et analysé par HPLC-SAX, en utilisant la méthode décrite
 15 dans le brevet US2005/0186679. Les résultats montrent une disparition de au moins 80 % des espèces glycosérines présentent dans l'héparine de départ.

Spectre du mélange de polysaccharides dans D₂O (25°C, δ en ppm), principaux signaux: 2,05 (CH₃CO, s), 3,28 (CH, m), 3,65 (CH, m), 3,77 (CH, m), 4,05 (CH, m),
 20 4,10 (CH, s), 4,20 (CH, s), 4,25 (CH, d, 12Hz), 4,35 (CH, s), 4,42 (CH, m), 4,88 (CH, s), 5,22 (CH, s), 5,42 (CH, s).

2.2 Héparine dépolymérisée par héparinase 3 amino réduite :

0,5g d'héparine purifiée par héparinase 3 sont mis en solution dans une solution
 25 aqueuse 5 M de chlorure d'ammonium. 0,5 g de cyanoborohydrure de sodium sont ajoutés à la solution d'héparine. Le mélange est porté à 70°C pendant 24 heures. La solution est ramenée à une température proche de 20°C, diluée à l'eau (QSP 50 ml), puis déssalée sur une colonne de séphadex G10. La fraction obtenue est injectée sur une colonne de Q-sépharose. Le produit est élué à l'eau, puis avec un
 30 gradient en perchlorate de sodium. Le produit obtenu est déssalé sur une colonne de Séphadex G10 puis lyophilisé. On obtient 444 mg d'un lyophilisat blanc.
 Le rendement observé est de 89 %.

Le produit est engagé tel que dans l'étape suivante d'acylation.

Spectre du mélange de polysaccharides dans D₂O (25°C, δ en ppm), principaux signaux: 2,05 (CH₃CO, s), 3,28 (CH, m), 3,65 (CH, m), 3,77 (CH, m), 4,05 (CH, m), 4,10 (CH, s), 4,20 (CH, s), 4,25 (CH, d, 12Hz), 4,35 (CH, s), 4,42 (CH, m), 4,88
5 (CH, s), 5,22 (CH, s), 5,42 (CH, s).

2.3 Héparine dépolymérisée par Héparinase 3 amino réduite et biotinylée :

A une température voisine de 20°C, 200 mg d'héparine dépolymérisée amino réduite sont mis en solution dans 2 ml de solution 0,5 M d'hydrogénocarbonate de sodium. 37 mg de Sulfo-NHS-LC-Biotine sont ajoutés à la solution obtenue. La
10 solution obtenue est agitée à une température proche de 20°C pendant 1 heure. La solution est diluée par 4 ml de solution 0,5 M d'hydrogénocarbonate de sodium. 37 mg de Sulfo-NHS-LC-Biotine sont ajoutés et le mélange est agité pendant 2 heures. 37 mg de Sulfo-NHS-LC-Biotine sont ajoutés de nouveau et le mélange
15 réactionnel est agité pendant 16 heures. Le milieu réactionnel obtenu est dilué à l'eau (Q.S.P. 200 ml), filtré sur membrane 0,45 μ m et injecté sur une colonne de Q-Sépharose. Le produit est élué à l'eau, puis avec un gradient en perchlorate de sodium. Le produit obtenu est déssalé sur une colonne de Séphadex G10 puis lyophilisé. On obtient 188 mg d'un lyophilisat blanc.
20 Le rendement observé est de 94 %.

Le produit peut être contrôlé par dépolymérisation à l'aide d'un mélange d'héparinase 1 + 2 + 3 et analysé par HPLC-SAX, en utilisant la méthode décrite dans le brevet US2005/0186679.

25

Spectre du mélange de polysaccharides dans D₂O (25°C, δ en ppm), principaux signaux: entre 1,3 et 1,8 (CH₂ biotine, m), 2,05 (CH₃CO, s), 2,25 (CH₂CO biotine, t, 7Hz), 2,79 (1H, d, 12Hz), 3,00 (1H, dd, 12 et 5Hz), 3,20 (NCH₂ biotine, m), 3,30 (CH, m), 3,68 (CH, m), 3,80 (CH, m), 4,05 (CH, m), 4,10 (CH, s), 4,20 (CH, s), 4,25
30 (CH, m), 4,35 (CH, s), 4,45 (CH, m), 4,63 (NCH biotine, m), 4,85 (CH, s), 5,22 (CH, s), 5,42 (CH, s).

Exemple 2

3.1 Héparine selon US 2005215519 A1, dépolymérisation avec l'héparinase 3 :

A une température proche de 20°C, 1 g d'héparine selon US 2005215519 sont mis
5 en solution dans 15 ml de la solution aqueuse de 5 mM de phosphate de sodium
ajusté à $\text{pH} = 7,0 \pm 0,1$, 20 mM de chlorure de sodium et 1mg / ml de BSA. 0,5 UI
d'héparinase 3 sont ajoutés à la solution d'héparine. Le mélange réactionnel
obtenu est agité pendant 7 jours. 1 g de chlorure de sodium et 45 ml de méthanol
sont ajoutés au mélange réactionnel. La suspension obtenue est filtrée sur
10 membrane 0,45 μm . Le gâteau est lavé au méthanol, à l'éther diéthylique, puis
séché sous vide. On obtient 0,96 g d'un solide blanc.

Le rendement observé est de 96 %.

Le produit peut être contrôlé par dépolymérisation à l'aide d'un mélange
15 d'héparinase 1 + 2 + 3 et analysé par HPLC-SAX, en utilisant la méthode décrite
dans le brevet US2005/0186679. Les résultats montrent une disparition de au
moins 80 % des espèces glycosérines présentent dans l'héparine de départ.

Spectre du mélange de polysaccharides dans D_2O (25°C, δ en ppm), principaux
20 signaux: 2,05 (CH_3CO , s), 3,28 (CH, m), 3,65 (CH, m), 3,77 (CH, m), 4,05 (CH, m),
4,10 (CH, s), 4,20 (CH, s), 4,25 (CH, d, 12Hz), 4,35 (CH, s), 4,42 (CH, m), 4,88
(CH, s), 5,22 (CH, s), 5,42 (CH, s).

3.2 Héparine selon US 2005215519 A1 dépolymérisée par héparinase 3 et amino
25 réduite :

0,5 g d'héparine selon US 2005215519 traité par héparinase 3 sont mis en
solution dans 20 ml d'une solution aqueuse 5 M de chlorure d'ammonium. 0,5 g de
cyanoborohydrure de sodium sont ajoutés à la solution d'héparine. Le mélange est
porté à 70°C pendant 24 heures. La solution est ramenée à une température
30 proche de 20°C, diluée à l'eau (Q.S.P. 50 ml), puis déssalée sur une colonne de
Séphadex G10. La fraction récoltée est lyophilisée. On obtient 446 mg d'un
lyophilisat blanc.

Le rendement observé est de 89 %.

Le produit est engagé tel que dans l'étape suivante d'acylation.

Spectre du mélange de polysaccharides dans D₂O (25°C, δ en ppm), principaux signaux: 2,05 (CH₃CO, s), 3,28 (CH, m), 3,65 (CH, m), 3,77 (CH, m), 4,05 (CH, m), 4,10 (CH, s), 4,20 (CH, s), 4,25 (CH, d, 12Hz), 4,35 (CH, s), 4,42 (CH, m), 4,88 (CH, s), 5,22 (CH, s), 5,42 (CH, s).

3.3 Héparine selon US 2005215519 A1 dépolymérisée par héparinase 3 amino réduite et biotinylée :

A une température voisine de 20°C, 200 mg d'héparine dépolymérisée amino réduite sont mis en solution dans 2 ml de solution 0,5 M d'hydrogencarbonate de sodium. 37 mg de Sulfo-NHS-LC-Biotine sont ajoutés à la solution obtenue. La solution est agitée à une température proche de 20°C pendant 1 heure. La suspension obtenue est diluée par 4 ml de solution 0,5 M d'hydrogencarbonate de sodium. 37 mg de Sulfo-NHS-LC-Biotine sont ajoutés et le mélange est agité pendant 2 heures. 37 mg de Sulfo-NHS-LC-Biotine sont ajoutés de nouveau et le mélange réactionnel est agité pendant 16 heures. Le milieu réactionnel obtenu est dilué à l'eau (Q.S.P. 200 ml), filtré sur membrane 0,45 μ m et injecté sur une colonne de Q-Sépharose. Le produit est élué à l'eau, puis avec un gradient en perchlorate de sodium. Le produit obtenu est déssalé sur une colonne de Séphadex G10 puis lyophilisé. On obtient 188 mg d'un lyophilisat blanc.

Le rendement observé est de 94 %.

Le produit peut être contrôlé par dépolymérisation à l'aide d'un mélange d'héparinase 1 + 2 + 3 et analysé par HPLC-SAX, en utilisant la méthode décrite dans le brevet US2005/0186679.

Spectre du mélange de polysaccharides dans D₂O (25°C, δ en ppm), principaux signaux : entre 1,3 et 1,8 (CH₂ biotine, m), 2,05 (CH₃CO, s), 2,25 (CH₂CO biotine, t, 7Hz), 2,79 (1H, d, 12Hz), 3,00 (1H, dd, 12 et 5Hz), 3,20 (NCH₂ biotine, m), 3,30 (CH, m), 3,68 (CH, m), 3,80 (CH, m), 4,05 (CH, m), 4,10 (CH, s), 4,20 (CH, s), 4,25 (CH, m), 4,35 (CH, s), 4,45 (CH, m), 4,63 (NCH biotine, m), 4,85 (CH, s), 5,22 (CH, s), 5,42 (CH, s).

Les composés selon l'invention ont fait l'objet d'études biochimiques et pharmacologiques.

Mesure de l'activité anti-facteur IIa et de l'activité anti-facteur Xa

5

L'activité anti-facteur IIa (anti-FIIa) et l'activité anti-facteur Xa (anti-FXa) dans le plasma humain ou un système tampon sont analysés par méthode chromogénique : l'activité anti-facteur IIa est testée au moyen du kit d'anti-facteur IIa d'héparine d'Actichrome (American diagnostica) contenant le substrat chromogène S-2238, l' α -thrombine et l'ATIII humain (antithrombine III). L'activité anti-FXa est déterminée avec l'instrument automatisé de coagulation ACL 7000 (Instrumentation Laboratory) employant le kit Héparine (Instrumentation Laboratory) contenant de l'ATIII, le facteur Xa et le substrat chromogène S-2765. Les deux analyses sont réalisées exactement selon les instructions du fabricant.

15

Les standards suivants sont employés pour établir une courbe d'étalonnage standard pour mesurer l'activité in vitro des fractions d'énoxaparine biotinylée dans le plasma humain et le système tampon :

- 1er standard international pour les héparines de bas poids moléculaire (National Institute for Biological Standards and Control, Londres, R-U, établi en 1987, code n° 85/600)
- 2ème standard international pour les héparines de bas poids moléculaire (National Institute for Biological Standards and Control, Londres, R-U, établi en 1987, code n° 01/608, utilisé depuis juin 2006)
- Enoxaparine (Clexane®, sanofi-aventis, France) a été employé comme référence interne.

Pour les déterminations d'activité anti-FIIa, 10 μ l d'échantillon ou de standards internationaux des héparines de bas poids moléculaire sont dilués au 1:16 avec l'antithrombine dans le plasma humain ou le système tampon contenant Tris HCl 0,05 M, NaCl 0,154M, à pH 7,4. 10 μ l de cette solution sont ajoutés dans une plaque 96 puits microtitre. La mesure est reproduite en triple (sur 3 puits). La plaque microtitre est maintenue à 37°C en agitant à 300 t/min. 40 μ l de thrombine sont ajoutés à chacun des puits et incubés pendant exactement 2 mn. 40 μ l de Spectrozyme sont ajoutés. Après 90 secondes, la réaction est arrêtée par ajout de

40 µl d'acide acétique. L'absorption est mesurée à 405 nm en utilisant un SpectraMax 340 (Molecular devices).

5 Pour des mesures d'activité anti-FXa, l'échantillon ou les standards internationaux des héparines de bas poids moléculaire sont dilués dans le plasma humain ou le système tampon contenant Tris HCl 0,05 M, NaCl 0,154M, pH 7,4. Les échantillons contenant les héparinoïdes dans le plasma ou le tampon sont encore dilués au 1:20 avec un tampon de travail contenant l'ATIII, et placés en double dans le rotor de sondage. Le réactif facteur Xa et le substrat chromogène sont
10 versés dans les réservoirs indiqués de l'instrument automatisé de coagulation ACL 7000.

La mesure de l'activité anti-FXa est réalisée avec le protocole "héparine" intégrée dans le logiciel de l'ACL 7000. Pendant l'analyse, 50 µl de l'échantillon (dilué avec
15 le tampon de travail) sont mélangés à 50 µl du réactif facteur Xa. Après un temps d'incubation de 60 secondes à 37°C, 50 µl de substrat chromogène de concentration 1,1 mM sont ajoutés et les changements de l'absorption en fonction du temps sont mesurés à la longueur d'onde de 405 nM.

20 Les résultats obtenus sont décrits notamment dans le tableau ci-dessous :

25

30

35

	Activité anti-FXa UI / mg
Héparine EPB	235
Héparine EPB purifiée par dépolymérisation avec l'héparinase 3	251
Héparine EPB purifiée par dépolymérisation avec l'héparinase 3 amino réduite	217
Héparine EPB purifiée par dépolymérisation avec l'héparinase 3 amino réduite et biotinylée	218
Héparine selon US 2005215519 A1	214
Héparine selon US 2005215519 A1 dépolymérisation avec l'héparinase 3	257
Héparine selon US 2005215519 A1 dépolymérisation avec l'héparinase 3 amino réduite	203
Héparine selon US 2005215519 A1 dépolymérisation avec l'héparinase 3 amino réduite et biotinylée	214

Ainsi, la présente invention a également pour objet un procédé mettant en œuvre l'avidine ou la streptavidine caractérisé en ce qu'il permet de neutraliser les
5 héparines selon l'invention. L'avidine ou la streptavidine peuvent être utilisées pour la préparation de médicaments destinés à neutraliser les héparines selon la présente invention.

Les composés de la présente invention, lesdites héparines biotinylées, peuvent
10 être utilisés comme agents anti-thrombotiques. En particulier, ils sont utiles pour la prévention des thromboses veineuses, des accidents thrombotiques artériels, notamment dans le cas d'infarctus du myocarde ou l'angor instable, les thromboses artérielles périphériques telles que les arthériopathies des membres inférieurs, les thromboses artérielles cérébrales, et les accidents vasculaires
15 cérébraux. Ils sont également utiles dans la prévention et le traitement de la

prolifération des cellules musculaires lisses, l'angiogénèse, et comme agents neuroprotecteurs de l'athérosclérose et de l'artériosclérose.

Les composés selon l'invention peuvent être utilisés pour la préparation de médicaments destinés à traiter les maladies ci-dessus.

5

Selon un autre de ses aspects, la présente invention a donc pour objet une composition pharmaceutique contenant, en tant que principe actif, une héparine biotinylée selon l'invention ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables, éventuellement en association avec un ou plusieurs excipients inertes et appropriés.

10

Lesdits excipients sont choisis selon la forme pharmaceutique et le mode d'administration souhaités : orale, sublinguale, sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, transdermique, transmuqueux, locale ou rectale.

15

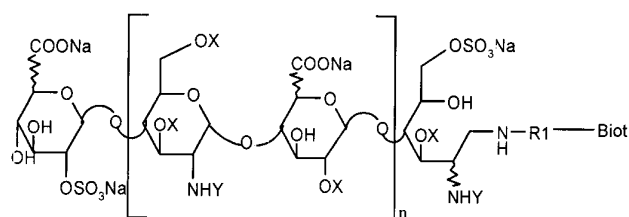
Dans chaque unité de dosage, le principe actif est présent dans les quantités adaptées aux doses journalières envisagées afin d'obtenir l'effet prophylactique ou thérapeutique désiré. Chaque unité de dosage peut contenir de 25 à 150 mg de principe actif, de préférence de 30 à 100 mg. Ces doses de composés anticoagulants peuvent être neutralisées par des doses d'avidine ou de streptavidine. .

20

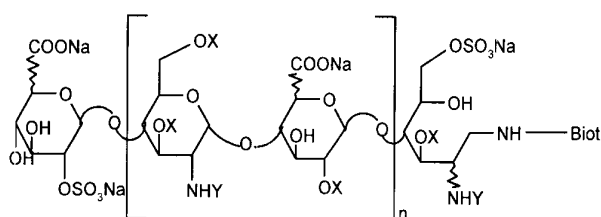
Les composés selon l'invention peuvent également être utilisés en association avec un ou plusieurs autres principes actifs utiles pour la thérapeutique souhaitée tels que par exemple des anti-thrombotiques, des anticoagulants, des antiagrégants plaquettaires.

REVENDICATIONS

1. Héparines biotinylées, caractérisées en ce que les polysaccharides constitutifs desdites héparines possèdent à leur extrémité réductrice une liaison covalente avec un groupe -Biot ou -R1-Biot, et répondent à la structure générale de formules (Ia) ou (Ib) telles que définies ci-dessous:



(Ia)



(Ib)

10

avec

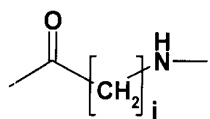
n ayant pour valeur moyenne de l'ordre de 25, pour une masse moléculaire moyenne de 15000 Da,

X représentant H ou SO_3Na ,

15 Y représentant COCH_3 ou SO_3Na ,

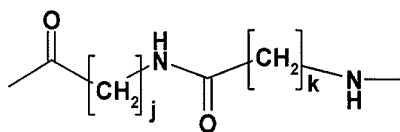
le trait ondulé désigne une liaison située soit au-dessous soit au-dessus du plan du cycle pyranosique.

- R_1 représentant un des enchaînements choisis parmi :



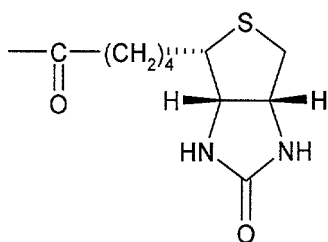
20

ou



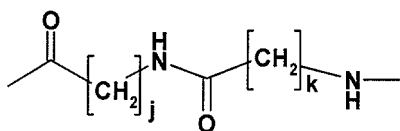
dans lesquels j et k, identiques ou différents, sont des entiers pouvant prendre toute valeur de 1 à 10 ;

- 5 - Biot représentant le groupe biotine de formule :



ainsi que leurs sels pharmaceutiquement acceptables.

- 10 2. Héparines selon la revendication 1 caractérisées en ce que R₁ représente un enchaînement,



dans lequel j et k sont identiques et ont pour valeur 5,

- 15 ainsi que leurs sels pharmaceutiquement acceptables.

3. Héparines selon l'une quelconques des revendications 1 ou 2 caractérisées en ce que lesdites héparines sont d'origine porcine, et plus particulièrement issues de muqueuses intestinales de porc.

4. Procédé pour la préparation des héparines biotinylées telles que définies dans l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que :

-on traite l'héparine avec l'héparinase 3,

- puis on effectue une amination réductrice sur le produit précédemment obtenu en présence d'un sel d'amine et d'un agent réducteur à une température comprise entre 20 et 80°C,
 - enfin on effectue une acylation avec un groupe -Biot ou -R1-Biot activé en présence d'une base en milieu aqueux,
- 5
- lesdites étapes du procédé de préparation pouvant être contrôlées par un suivi analytique HPLC type SAX, après dépolymérisation de ladite héparine en présence d'un mélange d'héparinase 1, 2 et 3.
- 10
5. Procédé pour la préparation des héparines biotinylées selon la revendication 4 caractérisé en ce que l'amination réductrice s'effectue en présence d'un sel d'halogénure d'ammonium et d'un sel de borohydrure à une température comprise entre 50 et 80°C.
- 15
6. Compositions pharmaceutiques contenant, en tant que principe actif, une héparine selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 éventuellement en association avec un ou plusieurs excipients inertes et appropriés.
7. Utilisation des compositions pharmaceutiques selon la revendication 6 comme agents antithrombotiques, pour la prévention des thromboses veineuses,
- 20
- des accidents thrombotiques artériels, notamment dans le cas d'infarctus du myocarde, ou l'angor instable, les thromboses artérielles périphériques telles que les arthériopathies des membres inférieurs, les thromboses artérielles cérébrales, et les accidents vasculaires cérébraux, pour la prévention et le traitement de la prolifération des cellules musculaires lisses, l'angiogénèse, et comme agent
- 25
- neuroprotecteurs de l'athérosclérose et de l'artériosclérose.
8. Utilisation d'une héparine biotinylée selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 pour la préparation d'un médicament utile dans la prévention des thromboses veineuses, des accidents thrombotiques artériels, notamment dans le cas
- 30
- d'infarctus du myocarde, ou l'angor instable, les thromboses artérielles périphériques telles que les arthériopathies des membres inférieurs, les thromboses artérielles cérébrales, et les accidents vasculaires cérébraux, 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.

9. Procédé mettant en œuvre l'avidine ou la streptavidine caractérisé en ce qu'il
5 permet de neutraliser les héparines selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.
10. Utilisation d'avidine ou de streptavidine pour la préparation de médicaments
destinés à neutraliser les héparines selon l'une quelconque des revendications 1 à
10 3.

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 691992
FR 0701053

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
D,Y	OSMOND R I W: "Protein-heparin interactions measured by BIAcore 2000 are affected by the method of heparin immobilization" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 310, 2002, pages 199-207, XP002450635	1-5	C08B37/10 A61K31/715 A61P7/02 A61P9/10 A61P25/28 A61P7/04
A	*Coupling via the reducing terminus, page 201* * figure 1C *	6-10	
Y	----- KETT W C ET AL: "Avidin is a heparin-binding protein. Affinity, specificity and structural analysis" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA - GENERAL SUBJECTS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 1620, no. 1-3, 17 mars 2003 (2003-03-17), pages 225-234, XP004410899 ISSN: 0304-4165	1-5	
A	*2.2.1. Heparin-biotin* *2.3. Preparation of low molecular weight heparin* *2.4. Biotinylation of heparin oligosaccharides*	6-10	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC) C08B A61K
Y	----- TSENG ET AL: "Fabrication and characterization of heparin functionalized membrane-mimetic assemblies" BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 27, no. 12, avril 2006 (2006-04), pages 2627-2636, XP005332693 ISSN: 0142-9612	1-5	C08B A61K
A	*2.3. Synthesis and characterization of biotin-conjugated heparin* * figure 2 * * tableau 1 *	6-10	
----- -/-			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
13 septembre 2007		Gerber, Myriam	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 691992
FR 0701053

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	WO 2006/030104 A (SANOFI AVENTIS [FR]; DUCHAUSSOY PHILIPPE [FR]; HERAULT JEAN PASCAL [FR] 23 mars 2006 (2006-03-23) * revendications 1-15 * -----	1-10	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
13 septembre 2007		Gerber, Myriam	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE**RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0701053 FA 691992**

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

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **13-09-2007**

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

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2006030104 A	23-03-2006	AR 051286 A1	03-01-2007
		AU 2005284080 A1	23-03-2006
		CA 2577258 A1	23-03-2006
		EP 1791872 A1	06-06-2007
		FR 2874924 A1	10-03-2006
		KR 20070051887 A	18-05-2007
