

CH 685 298 A5



CONFÉDÉRATION SUISSE
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

① CH 685 298 A5

⑥ Int. Cl.⁶: C 07 H 21/02
A 61 K 31/70

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein
Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

⑫ **FASCICULE DU BREVET** A5

⑲ Numéro de la demande: 3759/92	⑦ Titulaire(s): Crinos Industria Farmacobiologica S.p.A., Villa Guardia (Como) (IT)
⑳ Date de dépôt: 08.12.1992	
㉑ Priorité(s): 09.12.1991 IT 3294/91	⑧ Inventeur(s): Lanzarotti, Ennio, Milano (IT) Mantovani, Marisa, Villa Guardia (Como) (IT) Prino, Giuseppe, Milano (IT) Porta, Roberto, Cernobbio (Como) (IT) Cedro, Armando, Cislago (Milano) (IT) Moltrasio, Danilo, Rovellasca (Como) (IT)
㉒ Brevet délivré le: 31.05.1995	
㉓ Fascicule du brevet publié le: 31.05.1995	⑨ Mandataire: Patentanwälte Schaad, Balass & Partner, Zürich

⑤ **Oligodésoxyribo-nucléotides présentant des propriétés anti-ischémiques et leur procédé de préparation.**

⑥ L'invention décrit de nouveaux oligodésoxyribonucléotides d'origine animale, présentant un poids moléculaire compris entre 4000 et 10 000 Daltons, pouvant être obtenus par fractionnement des polydésoxyribonucléotides ou, autrement, par dépolymérisation chimique ou enzymatique d'acides désoxyribonucléiques à poids moléculaire élevé. Les nouveaux composés sont dotés d'une activité anti-ischémique significative.



CH 685 298 A5

Description

L'invention concerne de nouveaux oligodésoxyribo-nucléotides d'origine naturelle, présentant un poids moléculaire compris dans la plage allant de 4000 à 10 000 μ (daltons) et les procédés destinés à leur préparation.

Un autre objet de cette invention est l'utilisation des nouveaux composés comme agents anti-ischémiques.

Il doit être dit ici, à titre préliminaire, que les procédés mentionnés ci-dessus présentent la caractéristique générale commune de comprendre une étape de dépolymérisation préalable des acides désoxyribonucléiques à poids moléculaire élevé dans des milieux aqueux, suivie d'une précipitation des oligodésoxyribonucléotides ainsi obtenus, par addition de quantités appropriées de solvants organiques.

Les polymères selon cette invention, présentant à la fois un profil analytique d'importance et destinés à l'activité pharmacologique mentionnée ci-dessus, constituent une famille particulière parmi les oligodésoxyribo-nucléotides homologues, présentant un poids moléculaire situé dans les limites de la plage indiquée ci-dessus.

En fait, dans ce même intervalle que celui présenté ci-dessus, on peut trouver des composés qui sont différents des substances décrites ici pour ce qui concerne les profils analytiques importants, quand on considère plus en détail les valeurs d'un paramètre chimique et la valeur beaucoup plus faible de l'activité anti-ischémique.

Le paramètre chimique mentionné ci-dessus est le rapport entre les sommes des moles adénine + thymine/cytosine + guanine, ou A+T/C+G, qui est indiqué ci-après (tableau I) et doit se situer dans une plage déterminée pour être par conséquent considéré comme critique pour la définition de ses composés dans les limites de l'intervalle de poids moléculaire allant de 4000 à 10 000, qui est doté d'une activité anti-ischémique significative et par conséquent se révèle utile d'un point de vue thérapeutique.

L'état de l'art décrit déjà des polymères à faible poids moléculaire, obtenus par dépolymérisation d'acides désoxyribonucléiques naturels. De toute façon, comme expliqué en détail en considérant ce qui va suivre, il n'est pas considéré d'une telle importance d'anticiper la nouveauté des oligodésoxyribonucléotides ni d'en faire une question d'évidence.

Le EP-A 416 677 décrit des usages cosmétiques de compositions contenant des polydésoxyribonucléotides d'origine naturelle, présentant un poids moléculaire compris entre 10 000 et 100 000 et, pour ce qui est de l'intérêt considéré ici, un rapport molaire purines/pyrimidines (6+A/C+T) englobé par les limites correspondantes indiquées pour le même paramètre de cette invention (voir tableau I).

Cette description cependant n'est pas considérée comme éliminer l'étape inventive du premier objet de cette invention.

Par conséquent, par exemple, il ne va pas être justifié du tout de considérer les nouveaux polymères comme de «simples» équivalents à faible poids moléculaire des polydésoxyribonucléotides de cet art antérieur, étant donné que la plage citée ci-dessus des rapports molaires 6+A/C+T, prise en tant que telle, inclut une classe très large de composés, comprenant à la fois les oligo-désoxyribonucléotides dotés d'une activité pharmacologique mentionnée ci-dessus et ceux qui ne présentent au lieu de cela qu'une activité à peine existante.

Cette observation est d'ailleurs entièrement confirmée en considérant les valeurs et les plages de G+A/C+T prises en compte pour les composés de l'invention et indiquées dans le tableau I, conjointement avec ce qui est indiqué à la page 10 pour la préparation P0067.D V qui, comme représenté dans le tableau IV ci-après, est, au lieu de cela, dotée d'une faible activité anti-ischémique.

Les considérations ci-dessus mènent à la conclusion sans ambiguïté que, dans le EP-A 416 677 ne sont indiquées aucune sorte d'informations pouvant éventuellement aider l'homme de l'art à sélectionner ou à définir la classe de polymères qui y sont décrits.

Le WO 87/06235 indique des polydésoxyribonucléotides d'origine naturelle qui diffèrent des substances qui constituent le premier objet de cette invention pour ce qui concerne les valeurs élevées à la fois des paramètres d'hyperchromicité et de la rotation optique.

Sur cette question, il vaut la peine de noter que, dans la même demande de brevet, il est déjà décrit qu'en abaissant le poids moléculaire il se produirait une diminution du paramètre d'hyperchromicité. Cependant, il faut également reconnaître que le document ne donne, au lieu de cela, aucune information sur la façon dont c'est opérée la modification concomitante de la rotation spécifique.

En outre, également dans le WO 87/06235, comme ce qui était dit pour le EP-A 416 677, aucune sorte de suggestion n'est donnée concernant les valeurs particulières ou les intervalles mutuels entre les rapports molaires A+T/C+G qui auraient été éventuellement trouvés importants pour mettre en évidence l'activité décrite des composés.

Plutôt qu'à la lecture des indications ci-dessus concernant les documents, il apparaît, dans le cadre d'une observation d'ordre plus général, que le rapport molaire A+T/C+G n'a même pas été considéré séparément pour opérer la caractérisation chimique de ces polydésoxyribonucléotides.

De plus, le WO 87/06235 indique en outre une raison plus substantielle pour mettre en évidence le fait que la présente invention n'est pas chose évidente.

En fait, dans la description concernée à été trouvée la constatation que les polymères à faible poids moléculaire des acides désoxyribonucléiques présentant des valeurs du paramètre d'hyperchromicité h

inférieures à 10 manifesteraient une diminution importante de l'activité pharmacologique. De plus il était également affirmé que h prend le plus souvent la valeur pour les oligodésoxyribonucléotides qui présentent un poids moléculaire de 8000.

Cette proposition tant directement à mener aux conclusions suivantes:

5

a. Les oligodésoxyribonucléotides présentant une valeur de h inférieure à 10 ne devraient avoir aucune application thérapeutique.

b. Plus particulièrement, étant donné que, dans la référence faite ci-dessus, la forte diminution de l'activité pharmacologique a été mise en relation avec les valeurs de h inférieures à 10, l'homme de l'art expérimenté aura certainement considéré que plus la valeur de h est faible, plus l'activité résiduelle est basse, principalement lorsque h = 0, ce qui, selon le WO 87/06235 devrait correspondre, comme on l'a vu, à une poids moléculaire de 8000 pour ces polydésoxyribonucléotides.

Ces deux conclusions sont en fait manifestement en contradiction avec les constatations expérimentales de cette invention, qui vont être mises en évidences ci-après.

Les caractéristiques importantes physicochimiques et chimiques des nouveaux oligodésoxyribonucléotides sont indiquées au tableau I.

Les plages de variation caractérisées ici sont généralement tirées du tableau II, à l'exception de la rotation spécifique, dont les limites ont été déterminées en prenant en considération le tableau II (limite: +34° à +48°) conjointement avec les exemples: rotation spécifique de la préparation de P0097.N mentionnée dans l'exemple 8 (+32,5°) et de la préparation P0097.M indiquée dans l'exemple 9 (+30,9°).

Les paramètres mentionnés dans le tableau I ont été déterminés de la manière suivante.

La détermination du poids moléculaire pour des substances de la nature de celle de la présente invention dépend fortement du procédé adopté pour effectuer ces déterminations. Dans le cas des procédés HPLC, le choix des standards de référence influence fortement les résultats.

Pour la présente invention, les standards de référence ont été choisis en prenant en considération la similitude de la structure moléculaire ou de la configuration par rapport aux oligodésoxyribonucléotides soumis à l'analyse.

Le poids moléculaire a été déterminé par HPLC, sur un chromatographe travaillant en phase liquide équipé de deux colonnes, Biosil® TSK 300 et Biosil® TSK 250 (Biorad®) montées en série et réglées par thermostat à une température de 30°C. La solution composant la face mobile a été obtenue par dissolution de l'eau distillée des substances suivantes: Chlorure de sodium 5,844 g, NaH₂PO₄.H₂O 9,24 g, glycine 22,5 g. Le volume a été porté ensuite à 950 ml, le pH ayant été corrigé pour atteindre 6,8 (par utilisation de NaOH 6 N), puis la solution a été diluée pour obtenir un volume de 1 litre, à l'aide d'eau distillée.

Le débit était de 0,5 ml par minute, le volume de l'échantillon injecté de 6 µl (l'abréviation µl signifie microlitre) et la lecture de la densité optique de l'effluent a été de 260 nm.

L'étalonnage de la colonne a été effectué en utilisant un sulfonate de polystyrène (sel de sodium) de qualité standard avec un poids moléculaire connu (fournisseur: Polymers Laboratories Limited). Deux solutions, c'est-à-dire la solution A et B ont été utilisées pour l'étalonnage. Chacune des deux ayant contenu 4 standards de sulfonate de polystyrène (sel de sodium) en une concentration de 0,25%. Dans la solution A les 4 standards de sulfonate de polystyrène présentaient les poids moléculaires suivants: 1.800, 8.000, 46.000, 200.000, tandis que dans la solution B ils présentaient les poids suivants: 4.600, 18.000, 100.000, 400.000

45

Tableau 1
Limites de variation des paramètres analytiques qui caractérisent les oligodésoxyribonucléotides de l'invention

50

Poids moléculaire	4 000 à 10 000
h	< 10
A+T/C+G*	1,100 à 1,455
A+G/C+T*	0,800 à 1,160
rotation spécifique	+30° à +48°
* rapport molaire de base	

55

L'injection de chaque solution a été répétée un total de 3 fois.

L'échantillon a été injecté dans les mêmes conditions.

Le paramètre d'hyperchromicité h a été déterminé comme décrit dans Methods of Enzymology, volume III, pages 708 à 712 (voir également page 3 de WO 87/06235).

65

La rotation optique est déterminée sur un polarimètre automatique à la ligne D du sodium, en utili-

sant une solution de l'échantillon dans l'eau à 1% de poids par volume (indication en poids sur une base sèche), réglée à la température de 20°C.

Le calcul du rapport molaire de base A+T/C+G et de A+G/C+T a demandé la détermination préalable du pourcentage en poids correspondant de chaque base dans l'échantillon correspondant d'oligodésoxyribonucléotides. Cette analyse a été faite par HPLC, sur une colonne à échange d'ions après hydrolyse de l'échantillon comme décrit dans le EP 360 882.

Les processus par lequel ces substances peuvent être obtenues sont les suivants:

– précipitation par étapes du polymère, à partir de solutions aqueuses d'acétate de sodium à 0,8 M, contenant une quantité de 4% en poids/volume de sels de polydesoxyribonucléotides de sodium d'un poids moléculaire compris dans la plage allant de 15.000 à 75.000 daltons. Le processus a été effectué à la température de 20°C et la précipitation a été effectuée par addition à la solution d'un alkyl alcool inférieur, choisi dans le groupe composé de l'alcool éthylique, propylique et isopropylique, en suivant les étapes indiquées ci-après:

a. Addition de 0,8 volume d'alcool à la solution 0,8 M d'acétate de sodium contenant 4% en poids/volume de polydesoxyribonucléotides, de façon à précipiter la plus grande partie de la fraction de polydesoxyribonucléotides à poids moléculaire élevé,

b. à la solution hydroalcoolique obtenue au point a précédent et contenant 0,8 volumes d'alcool, on ajoute une quantité supplémentaire d'alcool, de manière à avoir globalement 1 volume de phase organique/volume de phase aqueuse initiale. Le surnageant a ensuite été éliminé et le précipité formé, qui contient la fraction polydesoxyribonucléotide à poids moléculaire élevé a été adjointe par mélange aux polymères selon l'invention, récupérés puis traités de la façon indiquée à l'étape d.

c. Le surnageant de l'étape b précédente a été mélangé à une quantité supplémentaire d'alcool, de façon à avoir à la fin 2 volumes d'alcool/volume de solution tampon initiale d'acétate de sodium à 0,8 M du point a. Dans ces conditions, il s'est produit une séparation puis une récupération des oligodésoxyribonucléotides selon l'invention.

d. Le précipité obtenu à l'étape b a été dissout dans de l'acétate de sodium à 0,8 M. La fraction de polydesoxyribonucléotide à poids moléculaire élevé a été ensuite éliminée par précipitation par addition de 1 volume d'alcool/volume de solution aqueuse. Le précipité a été éliminé par centrifugation et l'on a ajouté par mélange à la solution hydroalcoolique résiduelle de l'alcool, jusqu'à une quantité totale de solvant organique de 2 volumes/volume de phase aqueuse. Le précipité ainsi formé et constitué par les oligonucléotides selon l'invention a été récupéré.

Selon une méthode alternative de celle indiquée ci-dessus, on peut également opérer seulement une précipitation intermédiaire, par addition à la solution aqueuse initiale de 1 volume d'alcool. Dans ces conditions, on a ajouté a surnageant un volume d'alcool supplémentaire, en obtenant ainsi la précipitation des polymères attendus. Ce processus mène de toute manière à des productions moindres.

– Dépolymérisation par voie thermique des sels de sodium des acides désoxyribonucléiques à poids moléculaire élevé, dans un tampon aqueux composé d'acide acétique/acétate de sodium à 0,5 M et pH 4,1.

Ledit procédé a été effectué à une température variant de 65°C à 75°C, pendant une durée d'au moins 6 heures, de préférence inférieure à 10 heures, cette durée dépendant de toute façon du poids moléculaire de l'acide nucléique de départ. La dépolymérisation a été effectuée par surveillance à intervalles fixés du poids moléculaire. Le processus a été effectué jusqu'à ce que le poids moléculaire se situe dans les limites concernées indiquées au tableau 1.

La concentration en acide désoxyribonucléique dans ledit tampon d'acétate de sodium à 0,5 M était de 4% en poids/volume au, autrement, d'à peu près 12% en poids/volume, tandis qu'il apparaît qu'avec la concentration plus élevée, les productions sont quelques peu meilleures (voir exemples 6 à 11).

Le processus consiste en les étapes indiquées ci-après:

a. Dissolution d'acides désoxyribonucléiques à poids moléculaire élevé, puis addition de trihydrate d'acétate de sodium + acide acétique concentré (80%) pour donner au tampon la molarité et le pH requis.

b. Chauffage de la solution aqueuse, visqueuse, obtenue au point a précédent à une température variant de 65°C à 75°C, pendant une durée d'au moins 6 heures.

c. Abaissement, à la fin du traitement thermique du point b, de la température à 30°C, correction du pH pour atteindre 7,8 à 8,0 à l'aide de NaOH à 30%, puis nouveau chauffage à 85°C pendant 90 minutes.

d. Refroidissement de la solution à la température ambiante, correction du pH pour atteindre 6,5 à l'aide d'acide acétique concentré et précipitation des oligodésoxyribonucléotides par addition d'éthanol en une proportion variant entre 1,5 et 2 volumes/volume de solution aqueuse.

– Dépolymérisation par désoxyribonucléase des acides désoxyribonucléiques à poids moléculaire élevé, puis étape d'ultrafiltration, afin de concentrer la solution.

L'enzymolyse a été effectuée sur 1% en poids/volume d'acides nucléiques à poids moléculaire élevé,

pendant une durée de 24 heures, dans un tampon de phosphate de 0,1 M et de pH 7,0, en présence de chlorure de magnésium à 10 mM. A la fin, l'étape d'ultrafiltration a été effectuée de la façon suivante:

- 5 a. Ultrafiltration de la solution sur une membrane ayant un pouvoir séparateur de 10 000 daltons, jusqu'à ce que le volume de la solution soit réduit au 1/5 du volume initial.
- b. Dessalage de la solution de rétentat en opérant sa dialyse à volume constant (c'est-à-dire en ajoutant de l'eau à la solution afin de maintenir le volume égal au volume initial) contre un total de 5 volumes d'eau distillée.
- 10 c. Concentration des perméats réunis, collectes à partir des étapes a et b précédentes, pour atteindre 1/5 du volume initial, par ultrafiltration sur une membrane à pouvoir séparateur de 3000 daltons.
- d. Récupération des produits dissouts dans les rétentats de la première ultrafiltration (étape a, pouvoir séparateur de 10 000 daltons) et, respectivement de la deuxième ultrafiltration (pouvoir séparateur de 3000 daltons), après avoir au préalable augmenté la salinité des solutions ci-dessus à une valeur de concentration en sel de 0,8 M, ce sel étant de préférence de l'acétate de sodium, puis précipitation par
- 15 addition de 1,5 volumes d'éthanol/volume de phase aqueuse.

En variante, au lieu des étapes d'ultrafiltration décrites ci-dessus, on peut opérer la concentration de la solution en suivant la procédure suivante:

- 20 a. ultrafiltration sur une membrane ayant un pouvoir séparateur de 3000 daltons, jusqu'à ce que le volume du rétentat soit de 1/5 du volume initial.
- b. Dessalage de la solution de rétentat, on opérant sa dialyse à volume constant, contre un total de 5 volume d'eau distillée.
- 25 c. Récupération des produits dissouts du rétentat, comme décrit ci-dessus, au point d.

Ledit processus apparaît donner à peu près la même production que le processus précédent, avec comme avantage une plus grande simplicité de la procédure.

30 Dans la totalité des procédures décrites ci-dessus, le composé a été obtenu à partir de précipité par déshydratation, broyage puis séchage.

Sur le tableau II est indiqué le profil analytique de ces préparations, utilisées dans les essais pharmacologiques décrits ci-après.

35 La préparation d'oligodésoxyribonucléotide portant le code de laboratoire P0067.D V ayant un poids moléculaire inférieur à 10 000 et dotée d'une activité anti-ischémique bien inférieure que les polymères selon l'invention, a été obtenue par la méthode de fractionnement décrite à l'exemple 15. Cette préparation a présente les données analytiques suivantes (base poids sec): poids moléculaire 6600, H 1,4, A+T/G+C 1,494, A+G/T+C 0,914, rotation spécifique +37,2.

40 Il faut dire que la même méthode de fractionnement qu'utilisée pour obtenir le P0067.D V, lorsqu'on applique à d'autres lots d'acides désoxyribonucléiques dépolymérisés, donne de toute façon un produit présentant les mêmes caractéristiques analytiques, c'est-à-dire présentant une valeur élevée du rapport A+T/G+C. Une démonstration appropriée est donnée à l'exemple 16.

Tableau II

45 Caractéristiques physico-chimiques et chimiques des préparations d'oligonucléotides ayant été utilisées dans les tests pharmacologiques. En tête de chaque colonne est indiqué le code laboratoire

	P0085.C	P0085.D IV	P0085.M II	P0130.A	P00130.0	P0102.A	P0102.B
Poids moléculaire	8500	6400	9500	8000	9400	8000	4500
50 h	9,4	3,9	9,0	3,5	5,8	9,7	3,9
A+T/G+C*	1,298	1,446	1,305	1,263	1,230	1,230	1,110
A+G/T+C*	0,908	0,849	0,917	0,806	0,854	0,854	1,096
55 rotation spécifique	+47,3°	+38,6°	+46,2°	+34,8°	+36,2°	+36,2°	+47,3°
* rapport molaire							

60 Sur le tableau III sont représentées les données de l'activité fibrinolytique des composés selon l'invention, de la préparation P0067.D V et, à titre de comparaison, celle de l'agent fibrinolytique qu'est la plasmine, une enzyme dérivée d'un plasminogène. Il faut mentionner ici que la plasmine est utilisée dans la thérapie humaine.

L'activité a été exprimée en mcg de paranitroanilide (pNA) hydrolysé à partir des substrats de peptide S-2251 auquel le pNA est lié par une liaison covalente.

65 Ladite liaison présente une susceptibilité sélective à l'action des agents fibrinolytiques.

Par suite de cela, la quantité de pNA dégagée dans la solution est directement liée à l'activité fibrinolytique du composé essayé.

L'activité fibrinolytique a été testée in vitro, en utilisant le tripeptide S-2251 (H-D-valil-L-leucil-L-lysine paranitroanilide dihydrochlorure Kabi, Milan), tel que décrit pour l'essentiel par J. H. Verheijen et Alii in «A simple sensitive spectrophotometric assay for extrinsic (tissue-type) plasminogen activator applicable to measurements in plasma» *Thromb. Haemostas.* 48(3) pages 266 à 269, 1982.

La fraction de plasma euglobuline a été préparée en collectant du sang (8 ml) à partir de la veine marginale de l'oreille d'un lapin, au moyen d'une seringue contenant déjà 2 ml de solution à 3,8% en poids/volume de citrate tribasique de sodium. Le plasma obtenu par centrifugation a été ensuite séparé en petits échantillons de 0,5 ml, et à chaque petit échantillon a été ajouté 1 ml de la solution d'oligonucléotide, de telle façon à la fin on ait les deux concentrations d'échantillons suivantes: 200 et 800 mcg/ml de plasma (mcg signifie microgrammes). On a ajouté aux solutions 0,1 ml de solution aqueuse d'urokinase (50 U/ml), afin de convertir le plasminogène en plasmine. On a ajouté de l'acide acétique pour porter le pH à 5,4 et le volume de la solution a été ajusté à 8,5 ml, à l'aide d'eau distillée froide à une température de +4°C, de façon à obtenir la précipitation de l'euglobuline. L'étape a été effectuée par transfert des tubes de test dans un réfrigérateur (+4°C) pendant 2 heures. Il a été ensuite effectué une centrifugation pendant 10 minutes et l'on a séparé le surnageant. Le résidu a été prélevé avec 0,3 ml de solution tampon de tris hydrochlorure et réglé à pH 7,4, en le mettant en suspension. Aux 0,3 ml de la suspension ont été ajoutés 0,4 ml de tris hydrochlorure tampon puis a été effectuée une incubation pendant 10 autres minutes à 37°C. Il a ensuite été ajouté le tripeptide S-2251 (8,25 mg de la substance dans 5 ml d'eau distillée) et l'on a opéré une incubation pendant 5 autres minutes à la même température. L'enzymolyse a été bloquée par addition de 0,1 ml d'acide acétique à 1% et de 0,6 ml de NaCl 0,15 M. La quantité de chromogène dégagée dans les solutions de test a été déterminée par spectrophotométrie. La courbe de référence standard a été tracée à l'aide de plasmine bactérienne U.S. (Biosintex) essayée dans le même test aux doses suivantes: 40, 80, 160, 320 mcg. Les expériences ont été répétées un total de 6 fois, chaque fois en essayant l'échantillon et les quatre concentrations de plasmine indiquées ci-dessus.

Les résultats sont indiqués sur le tableau III.

Une caractéristique générale peut être tirée des données du tableau III, en ce disant que les oligodésoxyribonucléotides ayant un poids moléculaire inférieur à 10 000 présentent une activité fibrinolytique faible, voire nulle.

Ceci était de plus attendu au vu de l'enseignement du WO 87/06235. L'activité antischémique a été mise en évidence ex vivo sur le cœur de lapin isolé et perfusé, tel que décrit dans son principe par P.D. Henry dans le document «Myocardial contracture and accumulation of mitochondrial calcium in ischemia rabbit heart» *Am. J. physiol.* 233, 1977.

Les composés du test ont été perfusés en commençant 40 minutes avant l'occurrence ischémique, à la concentration de 400 mcg/ml et à un débit de 20 ml/minute.

Pendant la phase ischémique (40 minutes), le débit a été réduit à 0,2 ml/min. A la fin de cette phase, le débit initial a été repris et maintenu pendant 20 autres minutes. L'expérience a été répétée un total de 6 fois. Pendant la phase ischémique et le reperfusion ayant suivi, la pression teledistolique ventriculaire gauche des cœurs traités a été déterminée et les valeurs opposées à celles des cœurs non traités (groupe de contrôle). On a indiqué sur le tableau IV les activités anti-ischémiques des composés, déterminées par un examen, comme représenté sur ledit tableau, à la fois pendant la phase ischémique et pendant la phase de reperfusion venant ensuite. Au vu dudit tableau, il est évident que les oligodésoxyribonucléotides satisfaisant au profil analytique défini au tableau I présentent une activité anti-ischémique. Au contraire, la préparation P0067.D V, ayant un rapport molaire de base A+T/G+C (1,494) sort des limites 1,100–1,455 définies au tableau I, ce qui est le signe d'une activité beaucoup plus faible.

Tableau III
 Activité fibrinolytique in vitro des nouveaux oligonucléotides évaluée
 sur le substrat chromogénique tripeptide C-2251

Composé	mcg de paranitroaniline dégagée par le substrat S-2251 en 5 minutes	
	Concentration du composé	
	200 mcg/ml	800 mcg/ml
P0085.C	0,25 ± 0,16	0,89 ± 0,38
P0085.D IV	0,18 ± 0,09	0,03 ± 0,03
P0085.M II	0	2,49 ± 0,70
P0102. A	1,27 ± 0,52	2,63 ± 0,61
P0102.B	0,87 ± 0,57	0,56 ± 0,27
P0067.D V	0	non déterminé
plasmine	6,70*	27,01*

* Valeurs extrapolées à partir de l'équation de la ligne de régression de la plasmine $y = -0,26 + 0,034x$ ($r = 1$)

Tableau IV
 Activité anti-ischémique ex-vivo des nouveaux oligonucléotides

Composé	% d'inhibition / dégâts ischémiques ischémie induite expérimentalement	
	phase ischémique	phase de reperfusion
P0085.C	67	80
P0085.D IV	66	77
P0085.M II	68	79
P0102.A	61	69
P0102.B	42	60
P0130.A	63	74
P0130.C	57	66
P0067.D V	23	37

Les significations de ces données peuvent être mieux comprises en prenant en considération le fait que lorsque dans ledit modèle d'expérimentation, l'ischémie cardiaque est provoquée par la diminution du débit du liquide de perfusion, le cœur a été touché par un endommagement qui est mis en évidence fonctionnellement par la contraction ventriculaire. Dans la phase de reperfusion venant ensuite, lors du rétablissement des conditions initiales de débit, il a été provoqué une détérioration même pire, étant donné que, conjointement avec l'augmentation de la pression diastolique, déjà observée dans la phase précédente, il se produit un commencement simultané d'arythmies cardiaques.

A partir des données du tableau IV, on tire la conclusion que, dans la phase de reperfusion finale, les oligonucléotides selon l'invention offrent une protection substantielle contre l'ischémie induite de façon expérimentale, maintenant ainsi une activité contractile sensiblement normale du cœur, avec une réduction de sa résistance diastolique.

En conséquence de ce qui a été démontré ci-dessus, on tire la conclusion que les nouveaux composés peuvent être exploités utilement dans la thérapie de l'ischémie cardiaque.

D'autres objets de l'invention sont les formes de dosage contenant comme principe actif les nouvelles substances. Lesdites formulations peuvent être supposées pour une administration à la fois parentérale et orale.

Les compositions parentérales peuvent se présenter sous la forme de solutions stériles et apyrogénétiques, en ampoules scellées, ou, autrement, de liophilisates contenus dans les bouteilles scellées, à dissoudre extemporanément dans des solvants stériles aqueux.

On peut utiliser comme solvants aqueux des solutions isotoniques confectionnées avec des tampons classiques (citrate, phosphates et analogue), conjointement avec des conservateurs connus.

Les formulations orales peuvent être disponibles sous forme de pilules, pilules revêtues, capsules gélatine, granulés.

5 Lesdites formes de dosage peuvent être préparées suivant les techniques connues.

Par exemple, des formes de dosage oral peuvent être préparées par compression directe de poudres ou granulés et peuvent contenir des liants, des lubrifiants et des agents de désagrégation connus.

10 Les formes de dosage destinée à une administration parentérale peuvent contenir de 40 à 200 mg/ml de principe actif, de préférence de 80 à 160 mg/ml (pour les liophilisates des cas précédents, se référer à la concentration finale de la substance dans le solvant stérile), ceux destinés à l'administration orale sont situés entre 200 et 1500 mg par dose unitaire.

Exemple 1

15 Isolation des oligonucléotides selon la présente invention (préparations P0085.C et P0085.M II) par précipitation fractionnée à partir d'une solution aqueuse de défibrotide en présence d'acétate de sodium, par addition d'éthanol.

20 420 g de défibrotide (lot 82) ont été dissouts dans 10,5 l (concentration finale 4% en poids/volume) et l'on a ajouté 1155 g de trihydrate d'acétate de sodium (0,8 M). La température de la solution a été réglée à 20°C. 0,8 volume d'éthanol à 95% ont été ensuite ajoutés. Le surnageant a été récupéré par centrifugation (le précipité constitué de polydésoxyribonucléotides à poids moléculaire élevé a été séparé) et l'on a ajouté 0,2 volumes d'éthanol (volume total phase organique/phase aqueuse = 1). Une nouvelle centrifugation a été effectuée. Le précipité a été récupéré, déshydraté, séché et broyé. On a récupéré globalement 97,6 g (préparation P0085.B, consistant en un mélange des oligodésoxyribonucléotides selon l'invention conjointement avec des polydésoxyribonucléotides). On a ajouté encore de l'alcool au surnageant, de manière à obtenir 2 volume de solvant organique/volume de phase aqueuse. On a ainsi récupéré 40,5 g de solide (préparation P0085.C).

25 97,6 g de P0085.B ont été dissouts dans 2,4 l d'eau distillée et l'on a ajouté 269,5 g de trihydrate d'acétate de sodium. La température de la solution a été réglée à 20°C. 1 volume d'éthanol a été ajouté et la suspension ainsi obtenue a été centrifugée. On a ajouté encore de l'alcool au surnageant, de manière à obtenir un rapport final de 2 entre la quantité globale d'éthanol et celle de la solution aqueuse. On a ensuite récupéré 31,2 g (préparation P0085.M II).

30 La quantité totale d'oligodésoxyribonucléotides récupérés, c'est-à-dire P0085.C+P0085.M II, a été de 71,7 g (17,1%).

35

Exemple 2

Isolation des oligonucléotides (préparation P0085.D IV) par précipitation fractionnée avec l'éthanol, en présence d'acétate de sodium à partir d'une solution aqueuse contenant de la défibrotide.

40 20 g de la préparation de défibrotide d'un poids moléculaire de 17 000 daltons ont été dissouts dans 500 ml d'eau distillée. 55 g de trihydrate d'acétate de sodium ont été ajoutés et la température de la solution claire résultante a été réglée à 20°C. 500 ml (1 volume) d'éthanol a été ensuite ajouté et le précipité collecté par centrifugation à 3000 t/min pendant 5 minutes. On a ajouté au surnageant 500 ml d'éthanol (c'est-à-dire 2 volumes au total par rapport à celui de la phase aqueuse). La matière solide a été récupérée, déshydratée, broyée et séchée dans un four. On a obtenu 2,10 g. Production: 10,5%.

45

Exemple 3

Isolation des oligonucléotides (préparation P0085.D V) par précipitation fractionnée à l'éthanol en présence d'acétate de sodium à partir d'une solution aqueuse d'un polydésoxyribonucléotide.

50 20 g du sel de sodium d'un polydésoxyribonucléotide d'un poids moléculaire de 43 000 daltons ont été dissouts dans 500 ml d'eau distillée. On a ensuite suivi la procédure décrite dans l'exemple 2 précédent. On a obtenu 1,46 g à la fin (production 7,6%). La substance ainsi isolée présentait les caractéristiques analytiques suivantes (données reposant sur une base de poids sèche): poids moléculaire 6700, h 34, A+T/G+C 1,375, G+A/T+C 0,825, rotation spécifique +43,4.

55

Exemple 4

Isolation d'oligonucléotides (préparation P0085.D VI) avec la procédure de l'exemple 2.

60 20 g de défibrotide du lot n° 157, d'un poids moléculaire de 26 200, ont été traités suivant ledit exemple. On a récupéré 1,54 g (production 7,7%) à la fin. Les données analytiques (données reposant sur une base de poids sèche) ont été les suivantes: poids moléculaire 5900, h 5,7, A+T/G+C 1,343, G+A/T+C 0,835, rotation spécifique +41,6.

65

Exemple 5

Isolation d'oligonucléotides (préparation P0085.D VII) par précipitation fractionnée à l'éthanol en présence d'acétate de sodium, à partir d'une solution aqueuse de polydésoxyribonucléotide.

20 g de sel de sodium du polydésoxyribonucléotide d'un poids moléculaire de 75 000 daltons ont été dissouts dans 500 ml d'eau distillée. On a ensuite suivi la procédure indiquée dans l'exemple 2. On a récupéré 0,78 g (production 3,9%) d'un composé présentant les caractéristiques suivantes (données reposant sur une base de poids sèche): poids moléculaire 6100, h 7,1, A+T/G+C 1,415, G+A/T+C 0,860, rotation spécifique +43,6.

Exemple 6

Préparation des oligonucléotides selon l'invention, par dépolymérisation chimique dans un tampon aqueux à base d'acétate de sodium/acide acétique (préparation P0130.A).

800 g d'acide désoxyribonucléique à poids moléculaire élevé (poids moléculaire supérieur à 700.000) ont été dissouts dans 5280 ml H₂O en accompagnant d'un chauffage modéré. 426,4 g de trihydrate d'acétate de sodium ont été ajoutés, suivi par l'addition de 1,016 ml d'acide acétique à 80% (acide acétique concentré), pour corriger le pH et atteindre 4,1 et ensuite la solution visqueuse (concentration finale en polymère 12,7% en poids/volume; molarité en acétate de sodium 0,5 M) a été chauffée à 75°C pendant 6 heures. A l'achèvement de cette durée, la température a été abaissée à 30°C, le pH a été corrigé à 7,8 à 8,0 à l'aide de NaOH à 30% et la solution a encore été chauffée à 85°C pendant 90 minutes. Après refroidissement, le pH a été réglé à 6,5 à l'aide de CH₃COOH à 80%. La précipitation a été ensuite effectuée par addition de 1,5 volumes d'éthanol/volume de phase aqueuse. Le solide récupéré a été lavé, broyé et séché. On a obtenu 745 g (production 93,1%).

Exemple 7

Préparation des oligonucléotides selon l'invention, par depolymerisation chimique dans un tampon aqueux à base d'acétate de sodium/acide acétique (préparation P0130.C).

800 g d'acide désoxyribonucléique à poids moléculaire élevé ont été traités comme dans l'exemple 6. On a obtenu à la fin 765 g (production 95,6%).

Exemple 8

Préparation des nouvelles substances, par dépolymérisation dans une solution tampon à base d'acétate de sodium/acide acétique (préparation P0097.N).

50 g d'acide désoxyribonucléique à poids moléculaire élevé ont été dissouts à une température de 70°C dans 1 l d'eau. 80 g de CH₃COONa.3H₂O et 190 ml de CH₃COOH à 80% (pH final 4,1) ont ensuite été ajoutés (concentration en polymère: 4% en poids/volume, molarité en acétate de sodium: 0,5 M). La solution résultante a été chauffée à 70°C pendant 24 heures. On a ensuite opéré un refroidissement et la température a été abaissée à 30°C puis l'on a suivi la procédure décrite dans l'exemple 6 précédent. 33,5 g de produit ont été obtenus (production 67%). Les données analytiques (données reposant sur une base de poids sèche) ont été les suivantes: poids moléculaire 8100, h 5,3, A+T/G+C 1,037, G+A/T+C 0,865, rotation spécifique +32,5.

Exemple 9

Préparation des nouvelles substances, par dépolymérisation dans un tampon aqueux à base d'acétate de sodium/acide acétique (préparation P0097.M).

50 g d'acide désoxyribonucléique à poids moléculaire élevé ont été traités comme indiqué dans l'exemple 8, tandis qu'au lieu de cela la durée de la dépolymérisation a été ramenée à 16 heures et la précipitation opérée par addition de 2 volumes d'éthanol. 35,5 g de produit ont été obtenus (production 71%). Les données analytiques (données reposant sur une base de poids sèche) ont été les suivantes: poids moléculaire 6200, h 1,0, A+T/G+C 1,167, G+A/T+C 0,830, rotation spécifique +30,9.

Exemple 10

Préparation des oligonucléotides, par dépolymérisation dans un tampon aqueux à base d'acétate de sodium/acide acétique (préparation P0123.B).

100 g d'acide desoxyribonucléique à poids moléculaire élevé ont été dissouts dans 660 ml d'eau. La dissolution a été ensuite effectuée avec accompagnement d'un chauffage modéré. 53,5 g de CH₃COONa.3H₂O et 127 ml de CH₃COOH à 80% ont ensuite été ajoutés.

Le pH final était de 4,1 et le concentration finale en polymère de 12,7% en poids (molarité saline 0,5 M). La solution résultante a ensuite été traitée à 65°C pendant 16 heures puis traitée comme décrit dans l'exemple 6. 78,6 g de produit ont été obtenus (production 67%). Les données analytiques (don-

nées reposant sur une base de poids sèche) ont été les suivantes: poids moléculaire 8400, h 6,4, A+T/G+C 1,174, G+A/T+C 0,941, rotation spécifique +38,9.

Exemple 11

5 Préparation des oligonucléotides, par dépolymérisation dans un tampon aqueux à base d'acétate de sodium/acide acétique (préparation P0123.H).

10 100 g d'acide désoxyribonucléique à poids moléculaire élevé ont été traités comme indiqué dans l'exemple 10. La durée de la dépolymérisation a été fixée à 22 heures. 85,9 g de produit ont été obtenus. Les données analytiques (données reposant sur une base de poids sèche) ont été les suivantes: poids moléculaire 7000, h 1,9, A+T/G+C 1,305, G+A/T+C 0,875, rotation spécifique +35,4.

Exemple 12

15 Préparation des oligonucléotides selon l'invention, par dépolymérisation enzymatique des acides désoxyribonucléiques à poids moléculaire élevé au moyen d'une désoxyribonucléase (préparations P0102.A et P0102.B).

10 g de sel de sodium des acides désoxyribonucléiques à poids moléculaire élevé ont été dissouts dans 1 l de tampon phosphate à 0,1 M, de pH 7 et contenant du Mg Cl₂ en concentration 10 mM.

20 On a ajouté à la solution finale, visqueuse et opalescente, 3,67 g de désoxyribonucléase brute. On a effectué une enzymolyse à 37°C pendant 24 heures. A la fin, le volume de la solution a été réduit à 1/5 du volume initial, par ultrafiltration sur une membrane présentant un pouvoir de séparation de 10 000 daltons.

On a collecté 0,81 de perméat.

25 Le concentré (rétentat) a été dessalé en lui faisant subir une dialyse à un volume constant avec 1 l d'eau et une précipitation avec addition de 22 g de trihydrate d'acétate de sodium (0,8 M), puis addition de 1,5 volume d'éthanol.

4,88 g de produit ont été obtenus (production 49%) (préparation P102.A).

30 Les perméats provenant de l'ultrafiltration mentionnée ci-dessus et des étapes de dessalage ont été unis et concentrés à 1/5 du volume initial, par ultrafiltration sur une membrane présentant un pouvoir de séparation de 3000 daltons.

La solution a ensuite été dessalée en lui faisant subir une dialyse à volume constant avec 5 volumes d'eau puis une lyophilisation.

24,7 g de produit ont été obtenus (production 25%) (préparation P102.B).

35

Exemple 13

Préparation des oligonucléotides, par dépolymérisation enzymatique des acides désoxyribonucléiques à poids moléculaire élevé au moyen d'une désoxyribonucléase.

40 (préparations 0186/91220.A et 0186/91220.B). 5,5 g de sel de sodium des acides désoxyribonucléiques à poids moléculaire élevé ont été dissouts dans 1 l de tampon phosphate à 0,1 M, de pH 7 et contenant du Mg Cl₂ en concentration 10 nM. On a ensuite suivi la procédure de l'exemple 12 précédent.

A partir de la solution de rétentat, on a obtenu 1,14 g (20,7%) de composé (0186/91220.A) présentant les données analytiques (données reposant sur une base de poids sèche) suivantes: poids moléculaire 5000, h 5,4, A+T/G+C 1,266, G+A/T+C 1,106, rotation spécifique +37,4.

45

Exemple 14

50 Préparation des oligonucléotides, par dépolymérisation enzymatique des acides désoxyribonucléiques à poids moléculaire élevé (préparation 0186/91217).

11 g des acides désoxyribonucléiques à poids moléculaire élevé ont été dissouts dans 1,1 l du tampon indiqué à l'exemple précédent. La digestion a été effectuée par utilisation de la désoxyribonucléase selon la procédure de l'exemple 12. Le volume de solution a ensuite été réduit 1/5 du volume initial, par ultrafiltration sur une membrane présentant un pouvoir de séparation de 3000 daltons. La solution a ensuite été dessalée en lui faisant subir une dialyse à volume constant avec 5 volumes d'eau, puis la solution a été salée et précipitée comme décrit pour l'exemple 12 pour la préparation du P0102A. On a obtenu à la fin 8,25 g (75%) d'un produit ayant les caractéristiques suivantes (données reposant sur une base de poids sèche): poids moléculaire 5600, h 5,8, A+T/G+C 1,140, G+A/T+C 1,010, rotation spécifique +41,5.

60

Exemple 15

Méthode utilisée pour obtenir P0067.D V.

65 68 litres des liqueurs mère provenant de la précipitation des polydésoxyribonucléotides obtenues par

dépolymérisation d'acides désoxyribonucléiques à poids moléculaire élevé (préparation de défibrotide, lot 73) selon la méthode décrite dans le WO/87/06235 et contenant encore une quantité théorique de 1250 g d'acides désoxyribonucléiques, 1 partir de tampon d'acétate en solution aqueuse et 1,5 partie d'éthanol se sont vu ajouter encore 13,6 l (0,5 part) du même solvant organique. Le poids du précipité ainsi obtenu état de 36,4 g.

Exemple 16

Méthode utilisée pour obtenir P0067.D IV.

68 litres des liqueurs mères provenant de la précipitation des polydésoxyribonucléotides obtenues par dépolymérisation d'acides désoxyribonucléiques à poids moléculaire élevé (préparation de défibrotide, lot 72) selon la méthode décrite dans le WO/87/06235 et contenant encore une quantité théorique de 1250 g d'acides désoxyribonucléiques ont été traités comme dans l'exemple 15. Il a été obtenu 34,8 g de préparation P0067D.IV ayant les caractéristiques analytiques suivantes (données reposant sur une base de poids sèche): poids moléculaire 6100, h 0, A+T/G+C 1,508, G+A/T+C 0,917, rotation spécifique +35,9.

Exemple 17

Composition pharmaceutique pour utilisation parentérale.

Oligodésoxyribonucléotides	250 mg
dihydrate de citrate de trisodium	25 mg
methyl p.hydroxybenzoate	3,13 mg
propyl p.hydroxybenzoate	0,62 mg
eau distillée	2,5 ml

Exemple 18

Composition pharmaceutique pour usage oral.
Capsules gélatine dures.

Oligodésoxyribonucléotides	350 mg
lactose	56,75 mg
dioxyde de silicium colloïdal	0,7 mg
stéarate de magnésium	3 mg

Revendications

1. Oligodésoxyribonucléotides d'origine naturelle caractérisé par les paramètres analytiques suivants: Poids moléculaire 4000 à 10 000 μ (daltons), h < 10, A+T/C+G 1,100 à 1,455, A+G/C+T 0,800 à 1,160, rotation spécifique +30° à +48°.

2. Procédé de préparation d'oligodésoxyribonucléotides selon la revendication 1, caractérisé en ce que lesdits composés sont obtenus par précipitation, opérée par étape, à 20°, à partir de 0,8 M de solutions aqueuses d'acétate de sodium de sel de sodium de polydésoxyribonucléotide, par addition d'un alkyl alcool inférieur.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que ledit alkyl alcool inférieur est choisi dans le groupe composé des alcools éthylique, propylique et isopropylique.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que ledit alkyl alcool inférieur est l'alcool éthylique.

5. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la quantité de sel de sodium polydésoxyribonucléotide est de 4% en poids par unité de volume.

6. Procédé selon l'ensemble des revendications 2 et 5, caractérisé en ce que le dit sel de sodium polydésoxyribonucléotide présente un poids moléculaire compris dans la plage allant de 15 000 à 75 000 μ (daltons).

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le polydésoxyribonucléotide est la défibrotide.

8. Procédé selon l'ensemble des revendications 2 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- a. Addition de 0,8 volume d'alcool à la solution 0,8 M d'acétate de sodium contenant 4% en poids par unité de volume de polydésoxyribonucléotides.
- b. Addition supplémentaire à la dite solution hydroalcoolique d'une quantité supérieure d'alcool, de manière à présenter globalement un volume de phase organique par volume de phase aqueuse de départ et ensuite élimination du surnageant avec récupération du précipité formé.
- 5 c. Mélange du surnageant provenant de l'étape b précédente avec un quantité supplémentaire d'alcool de façon à avoir deux volumes d'alcool par volume de la solution tampon aqueuse d'acétate de sodium 0,8 M de départ, du point a et récupération de la substance ayant été séparée dans ces conditions.
- 10 d. Mise en solution du précipité obtenu à l'étape b de l'acétate de sodium à 0,8 M, addition de un volume d'alcool par volume de solution aqueuse, élimination du précipité formé par centrifugation, mélange de la solution hydroalcoolique subsistant, avec de l'alcool, pour obtenir un total de deux volumes d'alcool par volume de la phase aqueuse et récupération du précipité.
- 15 9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 7, caractérisé en ce qu'il a été effectué une précipitation intermédiaire par addition, à la solution de départ de polydésoxyribonucléotides, d'un volume d'alcool et le surnageant se voyant en outre ajouter un volume d'alcool pour obtenir de cette façon la précipitation des polymères.
- 20 10. Procédé de préparation des composés de la revendication 1, caractérisé en qu'il est effectué par dépolymérisation sous l'effet de la chaleur des sels de sodium de acides désoxyribonucléiques de poids moléculaire élevé dans un tampon aqueux composé d'acide acétique/acétate de sodium à 0,5 M, à pH 4,1.
11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il est effectué à des températures variants de 65°C à 75°C pendant une durée d'au moins 6 heures, selon le poids moléculaire de l'acide nucléique de départ.
- 25 12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 11, caractérisé en ce que la dépolymérisation est effectuée jusqu'à ce que le poids moléculaire tombe dans une plage comprise entre 4000 et 10 000 μ (daltons).
13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 12, caractérisé en ce que la concentration en acide désoxyribonucléique dans ledit tampon d'acétate de sodium à 0,5 M est de 4% en poids par unité de volume ou, autrement, d'à peu près 12% en poids par volume.
- 30 14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que la concentration de l'acide désoxyribonucléique est d'à peu près 12%.
15. Procédé selon l'ensemble des revendications 10 et 14, caractérisé en ce qu'il consiste en les étapes suivantes:
- 35 a. Dissolution d'acide désoxyribonucléique à poids moléculaire élevé, puis addition d'acétate trihydrate de sodium plus d'acide acétique concentré (80%) pour produire la concentration molaire et le pH requis pour le tampon.
- b. Chauffage de la solution aqueuse obtenue au point a précédent, à une température variant entre 65°C à 75°C pendant une durée de moins de 6 heures
- 40 c. Abaissement à la fin du traitement thermique de la température à 30°C, correction du pH pour atteindre 7,8 à 8,0 à l'aide de NaOH à 30%, puis, de nouveau, chauffage à 85°C pendant 90 minutes.
- d. Refroidissement de la solution à la température ambiante, correction du pH à 6,5 à l'aide d'acide acétique concentré et précipitation des oligodésoxyribonucléotides par addition d'éthanol en une proportion variant entre 1,5 et 2 volumes/volume de solution aqueuse.
- 45 16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que la durée du chauffage à une température variant de 65 à 75°C est inférieure à 10 heures.
17. Procédé d'obtention des oligodésoxyribonucléotides selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste en une dépolymérisation enzymatique des acides désoxyribonucléiques à poids moléculaire élevé par utilisation de désoxyribonucléase suivie d'une étape d'ultra-filtration afin de concentrer la solution.
- 50 18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que l'enzymolise avec désoxyribonucléase est effectué sur 1% en poids par volume de solutions d'acide nucléique à poids moléculaire élevé, pendant une durée de 24 heures, dans un tampon à base de phosphate de 0,1 M et de pH 7, en présence de chlorure de magnésium en concentration 10 mM.
19. Procédé selon l'ensemble des revendications 17 et 18, caractérisé en ce que la concentration par ultra-filtration est effectuée selon les étapes suivantes:
- 55 a. Ultra-filtration de la solution pour retenir l'enzymolyse (rétentat), sur une membrane ayant un pouvoir séparateur de 10 000 jusqu'à ce que la solution est un volume qui soit du 1/5 de la solution de départ.
- b. Dessalage de la solution de rétentat par dialyse de cette dernière à un volume constant, à l'aide de 5 volumes d'eau distillée.
- 60 c. Concentration des perméats réunis, collectés à partir des étapes précédentes a et b, pour arriver à 1/5 du volume de départ par ultra-filtration sur une membrane à pouvoir séparateur de 3000 μ (daltons).
- d. Récupération des produits dissouts des solutions concentrées à partir des rétentats venant de la première (étape a) et seconde (étape c) ultrafiltration.
- 65

20. Procédé selon l'ensemble des revendications 17 et 18, caractérisé en ce que la concentration de la solution est effectuée selon les étapes suivantes:
- a. Ultra-filtration sur une membrane présentant un pouvoir séparateur de 300 m (daltons) jusqu'à ce que le volume de rétentat atteigne 1/5 du volume de départ.
 - 5 b. Dessalage de la solution de rétentat en opérant sa dialyse à un volume constant avec 5 volumes d'eau distillée.
 - c. Récupération des produits dissous à partir des rétentats.
21. Procédé selon l'ensemble des revendications 19 et 20, caractérisé en ce que la récupération des produits dissous est effectuée par précipitation, après avoir salée la solution jusqu'à une valeur 0,8 M de concentration en sel puis avoir ajouté 1,5 volumes d'éthanol.
- 10 22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que le sel ajouté est de l'acétate de sodium.
23. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 9, 10 à 16, 17 à 22, caractérisé en ce que le produit est obtenu à partir du précipitat, par déshydratation, broyage et séchage.
- 15 24. Oligodésoxyribonucléotides selon la revendication 1, comme médicament.
25. Utilisation des oligonucléotides selon la revendication 1, pour la préparation de médicaments ayant une action anti-ischémique.
26. Utilisation des oligodésoxyribonucléotides selon la revendication 25, pour la préparation des médicaments destinés à la thérapie des états d'ischémie cardiaque.
- 20 27. Compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles contiennent comme principe actif les oligodésoxyribonucléotides selon la revendication 1, conjointement avec des véhicules et excipients préparées sous forme appropriée en vue d'une administration parentérale et orale.
28. Compositions pharmaceutiques destinées à un usage parentérale, selon la revendication 27, caractérisées en ce qu'elles contiennent les oligodésoxyribonucléotides en une quantité variant de 40 à
- 25 160 mg/ml.
29. Compositions pharmaceutiques selon la revendication 28, caractérisées en ce que la quantité de principe actif est comprise entre 80 et 160 mg/ml.
- 30 30. Compositions pharmaceutiques pour usage oral selon la revendication 27, caractérisées en ce qu'elles contiennent une quantité de principe actif, destinée à un dosage unitaire, variant de 200 à 1500 mg/ml.

35

40

45

50

55

60

65