

Brevet N°

du 17 JAN 1961

Titre délivré :

GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG



Monsieur le Ministre
de l'Économie et des Classes Moyennes
Service de la Propriété Intellectuelle
LUXEMBOURG

Demande de Brevet d'Invention

I. Requête

La société dite : ITALFARMACO S.p.A., Viale Fulvio Testi, 30 (1)
2- 20126 MILAN (Italie), représentée par Monsieur Jacques
KUTSER, agissant en qualité de mandataire (2)

dépose(nt) ce douzième jour 1960 à quatre heures (3)
à 15 heures au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes à Luxembourg :

1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant :
la composition d'un médicament à base de (4)
amphigénine (5)
anticoagulante (6)

2. la déposition de pouvoir, datée de 10.01.1961 le 08.01.1961

3. la description en langue française de l'invention en deux exemplaires;

4. deux planches de dessin, en deux exemplaires;

5. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg.

le 17 jan 1961
je déclare(nt) en assumant la responsabilité de cette déclaration que l'es inventeur(s) est (sont) :

- Gianfranco Spatolli, Via 3000, 20126, Milan, Italie (5)

- Alessandro Spatolli, Via 3000, 20126, Milan, Italie

revendique(nt) pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de

(6) brevet déposée(s) en Italie

le 18 juin 1959 No. 22351 A/59 (8)

au nom de la déposante (9)

élit(é)lisent pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg
35, boulevard Royal (10)

sollicite(nt) la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté dans les
annexes susmentionnées. — avec ajournement de cette délivrance à 12 mois. (11)

Le mandataire

II. Procès-verbal de Dépôt

La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie et des
Classes Moyennes, Service de la Propriété Intellectuelle à Luxembourg, en date du :

17 jan 1961

à 15 heures



Pr. le Ministre
de l'Économie et des Classes Moyennes
F. G.

A. 68007

(1) Nom, prénom, firme, adresse — (2) s'il a été représenté par un agissant en qualité de mandataire — (3) date du dépôt
en toutes lettres — (4) titre de l'invention — (5) noms et adresses — (6) brevet, certificat d'addition, modèle d'origine — (7)
pays — (8) date — (9) déposant, titulaire — (10) adresse — (11) 6, 12 ou 18 mois

REVENDEICATION DE LA PRIORITE


D. 51.506

de la demande de brevet / du modèle d'utilité

En ITALIE

Du 18 juin 1980

N° 22851 A/80



Mémoire Descriptif

déposé à l'appui d'une demande de

BREVET D'INVENTION

au

Luxembourg

au nom de : ITALFARMACO S.p.A.

pour : Glucosaminoglycanes modifiées exerçant une activité
antilipémique et essentiellement exemptes d'activité
anticoagulante.

17

La présente invention concerne un dérivé obtenu par une forte N-désulfatation d'héparine, puis par une héli-succinylation complète du produit d'hydrolyse. Le produit ainsi obtenu n'exerce pratiquement aucune activité anticoagulante ($< 0,05$ unité U.S.P./mg (U.S.P. = Pharmacopée des Etats-Unis d'Amérique)), mais il exerce une activité hypolipidémiant qui est encore thérapeutiquement importante et qui est particulièrement appropriée pour la thérapie d'états dyslipidémiques.

Depuis longtemps, on connaît l'importance physiologique de plusieurs protéoglycanes et glucosaminoglycanes en dépit du fait que, fréquemment, on ne connaisse ni parfaitement, ni même partiellement le rôle physiologique réel et le mécanisme de fonctionnement. Les expressions utilisées dans la présente spécification sont celles adoptées par J.F. Kennedy dans "Proteoglycans-Biological and Chemical Aspects in Human Life" - Studies in Organic Chemistry - volume 2 Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam-Oxford-N.Y. - 1979.

On connaît également la haute activité thérapeutique de plusieurs glycosaminoglycanes (naturelles ou synthétiques) telles que, par exemple, l'héparine et le sulfate de dextrane. La première a été utilisée longtemps pour la thérapie d'états d'hypercoagulabilité, pour la coagulation intravasculaire largement répandue, pour le traitement de la préthromboembolie et de la post-thromboembolie, comme décrit, par exemple, par L.B. Jaques dans "Heparin, and old drug with a new paradigm" - Science, 206, 528, (1979) : V.V. Kakkar, D.P. Thomas - "Heparin Chemistry and Clinical Usage" - Academic Press, Londres-N.Y. 1976, ainsi que dans des états de dyslipidémie, comme décrit par J.F. Kennedy, L.B. Jaques, V.V. Kakkar, loc.cit. ; "Lipo-protein Metabolism" - Editor S. Eisenberg - Progress in Biochemical Pharmacology, volume 15 - Series Ed. R. Paoletti, S. Karger, Bâle, 1979.

Dans le cas spécifique de ces derniers états pathologiques, l'utilisation thérapeutique de l'héparine est basée sur un traitement prolongé, même en faibles doses. A la longue, ce traitement prolongé risque de provoquer, chez le patient, des états dangereux d'hypocoagulabilité. C'est pourquoi, on a tenté d'établir une séparation entre l'activité hypolipidémiante de l'héparine et l'activité qui a été considérée comme étant d'une nature hypocoagulatrice, par exemple, par des modifications structurales appropriées de l'héparine ou par fractionnement de l'héparine disponible dans le commerce. A présent, on a généralement reconnu et démontré que ces activités étaient associées à la formation, "in vivo", de complexes de glycosaminoglycanes/enzymes spécifiques. Ces complexes ont pour but, soit d'activer l'enzyme, par exemple, dans le cas du complexe antithrombine III/héparine en ce qui concerne l'activité anticoagulante de l'héparine, soit de rendre la catalyse plus aisée afin de mobiliser l'enzyme dans la circulation du sang, cette enzyme étant initialement fixée aux parois des vaisseaux.

Tel est le cas spécifique pour le complexe lipoprotéinlipase (LPL)/héparine (Hep), qui constitue le mécanisme utilisé pour expliquer l'activité hypolipidémiante également appelée "activité clarifiante" qu'exercent les glycosaminoglycanes comme décrit par J.F. Kennedy ; L.B. Jaques ; V.V. Kakkar et S. Eisenberg dans les publications mentionnées ci-dessus.

Il existe pas mal de doutes à propos de la nature de ces complexes, mais il est unanimement admis que le phénomène en cause est une interaction "in vitro" de nature exclusivement ionique comme décrit par J.F. Kennedy, page 173, et par L.B. Jaques dans les publications mentionnées ci-dessus,

6

et également une interaction "in vivo" de nature ionique ou, tout au plus, d'une nature presque semi-polaire compte tenu de la structure polyanionique de l'héparine. En fait, dans l'héparine, il existe plusieurs groupes sulfamidiques (N-sulfate), ainsi que plusieurs groupes sulfoesters (O-sulfate), les premiers étant plus labiles que les seconds vis-à-vis de l'hydrolyse acide (voir, par exemple, J.F. Kennedy, page 229 ; I. Danishefski, H.B. Eiber, J.J. Carr - Arch. Biochem. Biophys. 90, 114, 1960 ; K.H. Meyer, D.E. Schwartz - Helv. Chim. Acta, 33, 1651, 1950).

Cette constatation générale dérive d'un grand nombre d'observations expérimentales parmi lesquelles on mentionnera la perte progressive d'activité anticoagulante et clarifiante suite à l'hydrolyse acide (avec des acides minéraux) des groupes N-sulfate jusqu'à l'élimination complète des deux types d'activité en raison de la N-désulfatation totale et de l'O-désulfatation très réduite (voir J.F. Kennedy, page 229 ; S.S. Stivala, L. Yuan, J. Ehrlich, P.A. Liberti - Arch. Biochem. Biophys. 122, 32, 1967 ; S.S. Stivala, P.A. Liberti - Arch. Biochem. Biophys. 122, 40, 1967 ; S.S. Stivala, M. Herbst, O. Kratky, I. Piltz - Arch. Biochem. Biophys. 127, 795, 1968).

Il a été mentionné que ces activités pouvaient être rétablies à la fois qualitativement et quantitativement en régénérant les groupes N-sulfate par réaction des produits d'hydrolyse avec le complexe pyridine/SO₃ ou le complexe triméthylamine/SO₃ (voir J.F. Kennedy, page 230, et L. Levy, F.J. Petracek - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 109, 901, 1962) ; en effet, grâce à cette opération, le caractère polyanionique de la glycosaminoglycane est rétabli au même titre que l'aptitude à former le complexe ionique enzyme/héparine (voir S.S. Stivala, op. cit. 1967 ; et S.S. Stivala, op. cit. 1968).

En dépit des remarques qui précèdent, Levy a stipulé que l'hydrolyse acide (avec des acides minéraux) de l'héparine avec un degré de N-sulfatation supérieur à 33% conduisait à un produit ayant subi plusieurs modifications irréversibles pouvant être attribuées à un début de dépolymérisation et/ou d'O-désulfatation, si bien qu'il est impossible de rétablir l'activité initiale après avoir à nouveau effectué la sulfatation. En d'autres mots, si l'on régénère les groupes sulfate du produit que l'on obtient après une forte hydrolyse, dont la structure est modifiée et qui, en lui-même est inactif, on ne rétablit pas pour autant le degré d'ionocité qui est suffisant pour créer le complexe enzyme/héparine modifiée avec perte de l'activité biologique jusqu'à des valeurs qui ne sont pas significatives.


Ces observations expérimentales, ainsi que d'autres telles que, par exemple, les rapports de J.F. Kennedy et V.V. Kakkar, op. cit., concordent avec les observations de Levy et avec l'hypothèse logique selon laquelle l'interaction entre des enzymes de type coagulant et l'héparine, ainsi que l'interaction entre L.P.L. et l'héparine sont, pour les deux types de réaction, basées sur une affinité de nature électrostatique, c'est-à-dire anionique, cependant qu'il existe une différenciation entre ces deux mêmes types d'interaction. Etant donné que l'interaction de L.P.L./héparine est d'une nature lipophile légèrement plus forte en raison de la nature de l'activité de L.P.L., on a abouti à plusieurs conclusions :

- 1) L'activité lipasémique de plusieurs préparations pharmaceutiques disponibles dans le commerce est due à l'utilisation de substances actives qui sont soit l'héparine, soit des dérivés naturels plus ou moins désulfatés. Ces substances exercent une activité anticoagulante intrinsèque qui est

toujours très élevée dans le but de minimiser les risques dus à une hypocoagulabilité suite à un traitement prolongé comme c'est le cas lors de la thérapie de la dyslipidémie.

2) L'étude de nouveaux dérivés de glycosaminoglycanes, qui ont été modifiés vis-à-vis des produits naturels, mais qui sont toujours spécifiquement du type de l'héparine en ce sens qu'ils sont toujours des dérivés d'héparine, doit être basée sur une modification atteignant un degré tel que le produit final conserve toujours un important degré d'anionité.

3) La matière de départ utilisée pour obtenir ces dérivés ne peut être que l'héparine elle-même ayant subi une désulfatation à un degré différent et dans laquelle le caractère anionique a été rétabli avec introduction de groupes anioniques contenant de l'azote, ces groupes étant moins ionisés que le groupe sulfate, par exemple, des groupes carboxyliques. Ces dérivés exercent une activité lipoprotéino-lipasique qui est toujours importante, avec une activité anticoagulante réduite, si bien que ces dérivés réduisent les risques d'hypocoagulabilité en thérapie humaine. Toutefois, pour les raisons déjà invoquées, la N-désulfatation, de même que la régénération ultérieure du groupe anionique contenant de l'azote ne doivent jamais dépasser 33-35% des groupes N-sulfate initialement présents. En effet, on ne désire pas obtenir un produit final "reconstitué" qui possède un caractère extrêmement lipophile, qui est trop peu anionique et qui ne convient pas pour former un complexe avec L.P.L. Bon nombre de travaux de recherches ont été entrepris sur la base de ces observations, spécifiquement sur les dérivés N-succinylés de l'héparine, plus ou moins hydrolysés, comme décrit par I.B. Cushing dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique n°



3.118.816 accordé le 21 janvier 1964 à la firme "Abbott Labs" et ayant pour titre : "N-Succinyl heparin and Process" (= N-succinyl-héparine et son procédé de préparation), ainsi que dans les revendications du même brevet. La revendication la plus importante de ce brevet est celle basée sur la substitution (à un degré ne dépassant pas 35% des groupes N-sulfate de l'héparine constituant la matière de départ) par les groupes N-succinyle en conformité avec les travaux de Levy. Cette revendication est également basée sur l'hypothèse selon laquelle on a réduit excessivement l'activité lipasémique des dérivés N-désulfatés qui ont été ensuite soumis à une succinylation avec un degré de N-désulfatation supérieur à 35%. En effet, ces composés ont un caractère anionique trop faible, si bien qu'ils ne sont pas en mesure de former le complexe activateur "L.P.L./héparine modifiée". Les mêmes conditions d'hydrolyse acide avec HCl 0,086N au cours d'une période maximale de 3 heures permettent d'obtenir un dérivé qui est exclusivement N-désulfaté dans les intervalles décrits ci-dessus et ce, sans aucune O-désulfatation ou N-désacétylation. Ce produit de base que l'on pense être un produit optimum lorsqu'il a subi une succinylation avec du chlorure de succinyle dans du benzène et du bicarbonate de sodium, forme un complexe de N-succinyl-héparine qui est suffisamment ionique pour former le complexe avec L.P.L., si bien qu'il est rendu soluble dans le plasma et exerce une activité clarifiante correspondante. Toutefois, cette activité n'est pas suffisante pour permettre l'interaction avec l'antithrombine III, si bien que l'activité inhibitrice exercée par l'héparine dans les phénomènes de coagulation, est perdue. En d'autres mots, le brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 3.118.816 a eu pour objet de préparer un produit exerçant une activité clarifiante com-

h

comparable à l'activité de l'héparine, mais sans exercer la haute activité coagulatrice de cette dernière. La revendication 5 de ce brevet est basée sur l'utilisation d'un acide dilué et les exemples décrivent l'utilisation d'un acide minéral en une concentration ne dépassant pas 0,086M.

La haute activité lipasémique du produit obtenu démontre que la méthode adoptée par ces chercheurs est correcte. Toutefois, même si elle est réduite vis-à-vis de l'héparine constituant la matière de départ, l'activité anticoagulante résiduelle (8-10 unités U.S.P./mg) est toujours trop élevée pour que l'on puisse envisager une utilisation sans risque d'hypocoagulation en thérapie humaine au cours d'une période prolongée. Dans une publication récente (J. Biochem. 81, 989, 1979), K. Nagasawa et al. maintiennent que les héparines N-désulfatées à des degrés différents et même à des degrés élevés conservent 62 à 79% de l'activité anticoagulante initiale, ce qui est manifestement en contradiction avec les résultats obtenus au cours des recherches précitées de Levy et Stivala, ainsi qu'avec les résultats obtenus par la Demanderesse.

Toutefois, il doit être tenu compte du fait que Nagasawa a effectué la désulfatation avec du diméthylsulfoxyde et du méthanol à la température ambiante, c'est-à-dire dans des conditions très différentes de celles adoptées pour obtenir le produit de la présente invention (acides minéraux de différentes concentrations et à des températures qui sont toujours supérieures à la température ambiante).

L'exposé ci-dessus résume l'état de la technique antérieur à la présente invention. De façon étonnante, la Demanderesse a trouvé que, dans des conditions d'une hydrolyse beaucoup plus intensive (c'est-à-dire avec HCl 0,33N à une température de 100°C au cours d'une période de 6 heures) que dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 3.118.816 et que.

selon les travaux de Levy, le produit d'hydrolyse de l'héparine était biologiquement inactif et qu'après succinylation complète avec de l'anhydride succinique et du NaOH, on obtenait un dérivé pratiquement exempt de toute activité anticoagulante (soit moins de 0,05 unité U.S.P./mg), tandis que l'activité clarifiante était toujours thérapeutiquement importante.

Les conditions d'hydrolyse concernant la concentration de l'acide et le temps de la réaction, sont calculées de façon à provoquer une N-désulfatation totale et une O-désulfatation réduite. La succinylation intensive effectuée ultérieurement aboutit à la formation d'un produit qui est toujours reproductible en ce qui concerne son activité biologique et ses propriétés physicochimiques. Dans le produit obtenu, l'unité disaccharide est à base d'héparine, laquelle est constituée du 2-O-sulfate d'acide α -L-iduronique et du 6-O-sulfate d' α -D-glucosamino-2-N-sulfate avec une liaison 1,4 ou qui est constituée du 6-O-sulfate d'acide β -D-glucuronique et du 6-O-sulfate d' α -D-glucosamino-2-N-acétyle avec la liaison 1,4 comme décrit par R.W. Jeanloz "Heparin. Structure, Function and Clinical Implications", Edition R.A. Bradshaw et S. Wessler . Adv. Expl. Med. Biol. 52, 3, 1974.

Dans ce produit, on a introduit des unités hémisucciniques jusqu'à ce qu'on atteigne 1,2 unité disaccharide. En contraste direct, dans les produits mentionnés par Cushing, cette valeur est, tout au plus, de 0,6 lorsque l'héparine initiale subit une hydrolyse au cours d'une période de 3 heures avec une N-désulfatation à 35% correspondant à la limite maximale.

Tous les produits obtenus sous forme du dérivé succinyle suivant la présente invention présentent une perte totale d'activité anticoagulante qui est inférieure à 0,05 unité U.S.P./mg et cette caractéristique a été vérifiée avec

tous les types d'héparines qui ont été utilisés comme matière de départ. En fait, cette caractéristique a été confirmée au cours d'expériences effectuées avec de l'héparine ayant une activité anticoagulante se situant entre 150 et 180 unités U.S.P./mg. En outre, on a observé les propriétés suivantes :

1) Le produit a une composition qui est d'une nature constante lors de l'isoélectrofocalisation en utilisant différents types d'héparines comme matière de départ. De plus, ce produit possède un degré moyen d'anionicité qui est sensiblement inférieur aux valeurs obtenues suivant le brevet précité des Etats-Unis d'Amérique, ces valeurs variant en fonction de la durée d'hydrolyse et, partant, en fonction du degré de N-succinylation. De même, les produits obtenus suivant Cushing varient entre eux suivant la période d'hydrolyse et aucun de ces produits ne manifeste, lors de l'isoélectrofocalisation, un comportement semblable à celui du dérivé de la présente invention (voir figure 1).

La figure 1 montre qu'en plus d'une variation survenant dans le profil des bandes, l'intensité de la coloration est, avec un dépôt égal, plus faible dans le cas du produit de la présente invention, ce qui démontre une différence structurale, c'est-à-dire une plus faible affinité vis-à-vis des agents colorants.

2) Le produit préparé suivant la présente invention a un comportement constant lors de l'électrophorèse, conjointement avec les propriétés mentionnées ci-après. En outre, il possède un plus faible degré d'acidité totale non seulement vis-à-vis de l'héparine utilisée comme matière de départ, mais également vis-à-vis des dérivés obtenus par Cushing. En outre, les dérivés obtenus par Cushing sont sensiblement différents l'un de l'autre suivant la période d'hydrolyse et cette

différence est plus évidente encore lorsque le degré d'hydrolyse est faible.

3) Lorsqu'on analyse les propriétés du dérivé suivant la présente invention par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire protonique, ainsi qu'avec C_{13} , ainsi qu'on le décrira ci-après, on observe un haut degré de succinylation sur l'atome d'azote et, en partie également, sur l'atome d'oxygène. Ce degré de succinylation est de l'ordre de 1,2 unité hémi-succinique /unité disaccharide, ainsi qu'on l'a mentionné ci-dessus. En contraste direct, lorsqu'on examine les mêmes types de spectres obtenus avec les produits de Cushing dont le degré d'hydrolyse initiale est variable, on observe un degré maximum de succinylation de l'ordre de 0,6 unité hémi-succinique/unité disaccharide.

4) Activité antilipémique constante : lorsque, comme matière de départ pour l'hydrolyse, on utilise plusieurs types d'héparines d'origines différentes, on obtient toujours une substance exerçant une activité lipasémique constante égale à environ 50% de l'activité de l'héparine constituant la matière de départ (valeur qui est acceptable comme moyenne pour différents échantillons).

Cette activité correspond également à 50% de celle obtenue avec le dérivé de Cushing, c'est-à-dire le produit d'hydrolyse après une période comprise entre 2,5 et 3 heures. Toutefois, ce produit exerce toujours une activité anticoagulante se situant entre 8 et 10 unités U.S.P./mg. Il est à noter que l'activité lipasémique de l'héparine est beaucoup plus prolongée à la fois dans le cas du dérivé préparé suivant la présente invention et dans le cas du dérivé préparé suivant Cushing.

6

5) La toxicité aiguë est plus faible que celle de l'héparine constituant la matière de départ, ainsi que celle du produit de Cushing qui est obtenu par hydrolyse pendant une période de 2,5 à 3 heures et qui exerce une activité anticoagulante se situant entre 8 et 10 unités U.S.P./mg. En effet, chez les rats, la valeur DL_{50} (= dose létale à 50%) par administration intraveineuse est de 3,4 g/kg, tandis que la toxicité aiguë du sel de sodium de l'héparine de départ est d'environ 0,9-1 g/kg, la toxicité aiguë du dérivé de Cushing étant de 2,3 g/kg.

On donnera ci-après un exemple de préparation et de détermination des propriétés du produit suivant la présente invention.

Préparation

Dans un ballon de 3 litres muni d'un réfrigérant, d'un agitateur mécanique et d'une admission d'azote en vue de travailler sous une atmosphère inerte, on dépose 2 litres d'eau distillée et 200 g du sel de sodium d'héparine. Tout en agitant, on dissout le produit à la température ambiante, puis on ajoute 400 cm³ de HCl 2N. On élimine l'air de la solution claire au moyen d'azote et, tout en maintenant une atmosphère d'azote, on dépose la solution dans un bain-marie bouillant et on la maintient dans ces conditions pendant une période de 6 heures. On refroidit ensuite la solution à la température ambiante et, tout en refroidissant à la glace, on porte le pH à 8,5 par addition d'une solution saturée froide de NaOH. Tout en maintenant la température dans l'intervalle initial de 5 à 10°C et le pH, à une valeur d'environ 8 par addition d'une solution de NaOH, on ajoute, par portions, 400 g d'anhydride succinique. L'addition finale porte le pH à une valeur d'environ 7,4 à 7,5. On maintient la solution

froide sous agitation pendant 30 minutes, puis on ajoute trois volumes d'éthanol à 95°. Onessore à la trompe le précipité formé qui est initialement huileux, mais qui devient solide lorsqu'on le laisse reposer, après quoi on le sèche à l'air. On redissout le précipité dans 3 litres d'eau distillée et on le soumet à une dialyse dans un appareil d'une élimination nominale de 600 daltons vis-à-vis de l'eau distillée et jusqu'à élimination du succinate de sodium. On soumet ensuite la solution finale à une lyophilisation. On obtient 200 g d'un produit sous forme d'aiguilles.

Isoélectrofocalisation

On effectue la détermination suivant la méthode de P.G. Righetti et E. Gianazza, B.B.A. 532, 137 (1978). On utilise 7% de gel de polyacrylamide T contenant 1% L.K.B. 2,5-4% ; 1% L.K.B. 3-5 ; 0,1% L.K.B. 3,5-10 ampholine. On dissout les échantillons dans de l'urée 8M en une concentration de 20 mg/ml, puis on les applique sur du papier "Whatmann" (3MM) en quantités égales pour tous les échantillons (250 µg).

On effectue les essais dans les conditions suivantes : 1/2 heure + 3 heures ; 12 W et 100 V maximum ; T = 9°C. Coloration : bleu de toluidine dans de l'acide acétique à 2%. Les résultats sont repris en figure 1 dans laquelle les parties 1 et 2 se rapportent au dérivé de glycosaminoglycane, 250 µg (on a utilisé deux préparations provenant de charges différentes du sel de sodium d'héparine, préparation commerciale, exerçant une activité anticoagulante de 165 et 178 unités U.S.P./mg). Dans les figures annexées, les parties 3 et 4 ont été obtenues avec des dérivés provenant d'une charge du sel de sodium d'héparine ayant une activité anticoagulante de 165 unités U.S.P./mg, préparée suivant le procédé de Cushing avec des durées d'hydrolyse de 30 minutes et de 180 minutes respective-

ment, en une concentration de 250 μ g. La partie 5 correspond au sel de sodium d'héparine ayant une activité anticoagulante de 165 unités U.S.P./mg et à partir de laquelle on obtient les dérivés correspondant aux parties 2, 3 et 4 en une concentration de 250 μ g.

Electrophorèse

Les résultats d'électrophorèse reproduits en figure 2 ont été obtenus dans les conditions suivantes : acétate de baryum 0,1M, pH : 5,8 ; pellicule d'acétate de cellulose (Sepraphore III-Gelman) de 5,5 x 11 cm ; tension : 40 V ; essai effectué pendant une période de 4 heures à la température ambiante ; dépôt de 3 μ g. Coloration : bleu Alcian sous forme d'une solution de 150 mg dans 100 ml d'éthanol à 95°, dilué à 1:1 avec de l'acétate de sodium 0,5M, pH = 5,8.

On détermine la décoloration dans de l'acide acétique à 5%. On effectue la diaphanisation avec une solution d'acide acétique à 15%, du méthanol à 84%, du toluène à 0,5% et de l'acétone à 0,5% pendant une minute.

En figure 2, les taches a, b et d ont été formées avec des dérivés obtenus suivant la présente invention en utilisant, comme matière de départ, trois charges différentes d'héparine commerciale. La tache c a été obtenue avec le dérivé préparé suivant la méthode de Cushing après hydrolyse pendant 2,5 heures, l'échantillon ayant une activité anticoagulante résiduelle de 10 unités U.S.P./mg.

Les résultats repris en figure 3 ont été obtenus dans les conditions suivantes : solution d'acide trichloracétique 0,05M réglée à un pH de 3 avec du NaOH ; pellicule d'acétate de cellulose (Sepraphore III-Gelman) de 5,5 x 11 cm ; tension : 45 V ; essai effectué pendant une période de 3 heures à la température ambiante ; dépôt de 3 μ g. La coloration a été

déterminée comme décrit ci-dessus. On a également déterminé la diaphanisation comme décrit ci-dessus.

En figure 3, la partie a a été obtenue avec le dérivé préparé suivant la présente invention en utilisant, comme matière de départ, de l'héparine ayant formé la partie b, c'est-à-dire de l'héparine à 150 unités U.S.P./mg. La partie c a été obtenue avec un produit préparé suivant la méthode de Cushing après hydrolyse acide de la même héparine pendant 30 minutes, tandis que la partie d a été obtenue avec un autre produit préparé suivant la méthode de Cushing après hydrolyse acide pendant 180 minutes, toujours en utilisant la même héparine comme matière de départ.

Spectre de résonance magnétique nucléaire ^{13}C du dérivé de glycosaminoglycane

Les résultats ont été obtenus à 25,2 MHz dans du dioxanne- D_2O ; étalon interne : dioxanne (67,4 parties par million) ; les résultats sont exprimés en parties par million. Le procédé adopté a été décrit par G. Gatti, B. Casu, G.K. Hamer et A.S. Perlin, "Macromolecules" 12, 1001 (1979).

Le spectre comparé à celui du sel de sodium de l'héparine (ces spectres étant déterminés dans les mêmes conditions), donne les différences et signaux suivants :

- 1) On observe un nouveau signal à 181,8, attribuable au COO^- du radical succinique ;
- 2) un nouveau signal à 177, attribuable au $-\text{CONH}$ du radical succinique ;
- 3) un signal à 176,7, attribuable au COOH du radical iduronique, analogue à celui de l'héparine ;
- 4) un petit signal à 102, attribuable au C_1 des petites quantités du radical d'acide glucuronique, analogue à celui de l'héparine ;

5) un signal à 100, attribuable au C_1 du radical d'acide iduronique, analogue à celui de l'héparine ;

6) un nouveau signal à 95,3, attribuable au C_1 de l'unité de N-succinyl-glucosamine. D'une manière analogue, on observe la disparition du signal à 97,7, ce signal étant attribuable au C_1 du radical de N-sulfate de glucosamine qui est caractéristique à l'héparine constituant la matière de départ ;

7) une nouvelle série de signaux entre 72 et 76, attribuables aux C_2 et C_4 du radical N-succinylglucosaminique, ainsi qu'au C_2 du radical iduronique ; ces signaux du spectre de l'héparine sont rassemblés en un seul signal intense à 76 ;

8) une paire de signaux à 70 et 71, attribuables aux C_3 et C_5 du radical N-succinylglucosaminique, ainsi qu'aux C_3 et C_5 du radical iduronique, ces signaux étant analogues à ceux des mêmes atomes de l'héparine ;

9) un signal à 67, attribuable au C_6 du radical N-succinylglucosaminique, ce signal étant analogue au signal du C_6 du radical N-sulfonyl de l'héparine ;

10) un nouveau signal à 54,5, attribuable au C_2 du radical N-succinylglucosaminique. En même temps, on observe la disparition du signal à 58,8, attribuable au C_2 du radical N-sulfonylglucosaminique dans le spectre de l'héparine ;

11) deux nouveaux signaux à 33 et 33,5, attribuables aux $-\underline{CH_2}COO-$ et $-\underline{CH_2}-CO-NH-$ du radical succinique de la N-succinyl-héparine.

Spectre de résonance magnétique nucléaire ^{13}C du dérivé obtenu suivant la méthode de Cushing après hydrolyse acide pendant 180 minutes

Le spectre ^{13}C du produit donne les signaux décrits dans les paragraphes 1-5, 9 et 11 ci-dessus pour le composé de la présente invention.

En ce qui concerne le signal dû au C_1 du radical glucosaminique, qui est décrit dans le paragraphe 6 ci-dessus, on observe l'apparition du pic dû à la N-succinylglucosamine, tandis que l'on observe toujours le pic dû au C_1 du radical N-sulfonylglucosaminique, ce qui démontre que, dans cet échantillon, la N-désulfatation est incomplète et qu'il y a toujours un mélange de groupes N-sulfate et N-succinyle.

Les signaux dus aux C_3 , C_4 et C_5 du radical N-sulfonyl ou du radical N-succinyl-glucosaminique, ainsi qu'aux C_2 , C_3 , C_4 et C_5 du radical iduronique, apparaissent sous forme d'une série de pics qui peuvent être groupés en deux groupes principaux aux alentours de 70 et 76. En conséquence, l'état de choses se situe à un stade intermédiaire entre le cas de l'héparine et celui du dérivé préparé conformément à la présente invention (paragraphe 7 et 8 décrits ci-dessus).

On note l'apparition d'un nouveau pic à 54,5, correspondant au pic décrit dans le paragraphe 10 du dérivé faisant l'objet de la présente invention. Toutefois, le signal apparaissant à 58,8 et indiquant la présence du carbone C_2 du radical N-sulfonylglucosaminique de l'héparine est toujours présent.

Spectre de résonance magnétique nucléaire ^{13}C du dérivé obtenu suivant Cushing après hydrolyse acide pendant une période de 30 minutes

Le spectre est analogue à celui de l'échantillon obtenu après hydrolyse acide pendant 180 minutes et il indique un faible degré de succinylation. En effet, tous les pics décrits pour le produit obtenu après hydrolyse pendant 180 minutes, sont toujours présents. En particulier, les pics décrits dans les paragraphes 1 et 2 sont beaucoup moins intenses

que le pic décrit dans le paragraphe 3 à propos des spectres du composé de glycosaminoglycanes et du composé obtenu après hydrolyse pendant 180 minutes, ce qui indique un plus faible degré de succinylation.

Les pics décrits dans les paragraphes 3, 4, 5, 9 et 11 sont les mêmes pour le produit de glycosaminoglycane et pour le produit obtenu après hydrolyse pendant 180 minutes. Le signal de C_1 du radical de (N-sulfonyl-glucosamine) à 97,7 est présent, mais plus intense près du signal de C_1 de la N-succinyl-héparine à 95,3, ce qui démontre à nouveau un faible degré de succinylation (paragraphe 6 ci-dessus). Les signaux dus aux C_3 , C_4 et C_5 du radical N-sulfonyl- ou N-succinyl-glucosaminique, ainsi que ceux dus aux C_2 , C_3 , C_4 et C_5 du radical iduronique (paragraphe 7 et 8 ci-dessus) apparaissent sous une forme intermédiaire se situant entre les signaux du produit obtenu après hydrolyse pendant 180 minutes et les signaux obtenus avec l'héparine comme matière de départ.

Le pic accentué à 54,5 du C_2 du radical N-succinyl-glucosaminique est proche du pic à 58,8 dû au radical N-sulfonyl-glucosaminique, le premier étant plus intense que le second (paragraphe 10 ci-dessus).

Spectre de résonance magnétique nucléaire 1H enregistré avec "Varian XL-100" à 100 MHz

On utilise les spectres de résonance magnétique nucléaire 1H afin de déterminer le degré de succinylation en établissant une relation entre le signal d'hydrogène dans C_1 , deux atomes d'hydrogène/unité de disaccharide, à savoir un pour l'unité iduronique et un pour l'unité glucosaminique, ainsi que le signal des atomes d'hydrogène de l'acide succinique, soit un total de 4 atomes d'hydrogène/radical d'acide succinique. On obtient les résultats suivants :

1) dérivé préparé suivant la présente invention :
1,2 unité d'acide succinique/unité de disaccharide ;

2) dérivé obtenu suivant Cushing après hydrolyse
acide pendant 30 minutes : 0,2 unité d'acide succinique/
unité de disaccharide ;

3) dérivé obtenu suivant Cushing après hydrolyse
acide pendant 180 minutes : 0,6 unité d'acide succinique/
unité de disaccharide.

En conclusion, ces essais démontrent que le dérivé
obtenu suivant la présente invention est le résultat d'un
plus haut degré de désulfatation et de succinylation compara-
tivement au dérivé obtenu suivant Cushing, tandis que le
produit obtenu suivant la présente invention a subi une hydrolys
acide dans des conditions plus rigoureuses que celles adoptées
par Cushing, c'est-à-dire une hydrolyse pendant une période de
180 minutes.

Toxicité

La toxicité du dérivé de glycosaminoglycane, qui sera
démontrée dans les exemples ci-après, lesquels illustrent
l'activité lipasémique et l'activité clarifiante, a fait
l'objet d'essais sur deux espèces d'animaux, c'est-à-dire sur
des souris par voie intraveineuse, ainsi que sur des rats par
voie intraveineuse et également par voie intrapéritonéale et
par voie orale. Le support utilisé est une solution physiolo-
gique. Les valeurs DL_{50} exprimées en mg/kg sont les suivantes :

Espèce : souris mâles albinos "Swiss" d'un poids
moyen de 22 ± 1 g.

Administration intraveineuse : $DL_{50} = 3.414$ mg/kg
(2.927,6-3.826,2).

h

Espèce : rats albinos mâles "Wistar" d'un poids moyen de 150 ± 10 g.

Administration intraveineuse : DL_{50} : 2.400,2 mg/kg (2.100,2-2.782,6) :

administration intrapéritonéale : DL_{50} : > 3.500 mg/kg

administration orale : DL_{50} : > 5.000 mg/kg.

La valeur DL_{50} obtenue chez la souris par administration intraveineuse du dérivé préparé suivant Cushing est d'environ 2.300 mg/kg.

Activité sur l'hypercholestérolémie et l'hypertriglycéridémie provoquées par "Triton"

L'activité hypocholestérolémiante et l'activité hypotriglycéridique ont été déterminées par l'essai d'hypocholestérolémie et d'hypertriglycéridémie au moyen de "Triton" (WR-1339) comme indiqué par Garattini S., Morpurgo P., Paoletti R. : *Arzn. Forsch*, 9, 206 (1959) ; E. Marmo, E. Lampa et al. : *Archivo per le Scienze Mediche* 132, (3), 83 (1975).

On a effectué les expériences avec des rats albinos mâles adultes de la famille "Wistar" pesant entre 190 et 210 g et préalablement choisis au hasard.

On divise les animaux en groupes de 10 : un groupe reçoit uniquement le support du produit à examiner, c'est-à-dire la solution physiologique, tandis que l'on traite les autres groupes avec : 1) "Triton" et 2) "Triton" conjointement avec la substance à examiner suivant le mode d'administration et les dosages indiqués dans le tableau 1. Dans chaque cas, le "Triton" est administré en une dose de 200 mg/kg par voie intraveineuse à des rats maintenus à jeun pendant une période de 12 heures en les laissant simplement boire librement de l'eau.

Les substances devant être utilisées comme antagoniste sont administrées par voie intrapéritonéale ou par voie orale deux heures avant et deux heures après l'administration du "Triton". Entre l'administration du "Triton" et la deuxième administration du produit faisant l'objet de l'essai, on donne à nouveau de la nourriture aux animaux et, après avoir supprimé la nourriture, on leur laisse simplement le libre accès à l'eau. Au terme d'une période de 12 heures après l'administration du "Triton", on prélève un échantillon de sang par ponction cardiaque et l'on effectue la détermination des triglycérides suivant la combinaison d'essai de "Biochemia Boehringer". Il s'agit en l'occurrence d'une détermination enzymatique des triglycérides après saponification avec de l'hydroxyde de potassium éthanolique (KOH) suivant Eggstein M. : "Klin. Wschz." 44, 1966, 262. L'échantillon de sang fait également l'objet d'un essai de détermination de la teneur en cholestérol suivant la combinaison d'essai de Roschlav P., et al. : "Z. Klin. Chem. Klin. Biochem." 12, 1974, 403, par le procédé de catalyse, c'est-à-dire l'essai enzymatique colorimétrique. Les résultats sont repris dans le tableau 1.

Les tableaux 2 et 3 reprennent les résultats expérimentaux obtenus après provocation de l'hyperlipémie au moyen du "Triton", ces résultats étant obtenus par administration orale à des rats et suivant les méthodes décrites ci-dessus, de la substance active de glycosaminoglycane dans deux supports différents, cette substance étant d'une nature lipophile.

TABLEAU 1

Dosage des triglycérides et du cholestérol chez des rats "Wistar" pesant \pm 200 g et soumis à un traitement après provocation de l'hyperlipémie au moyen de "Triton" en une quantité de 200 mg/kg par voie intraveineuse.

Composé	Dose (mg/kg)	Mode d'admi- nistra- tion	Triglycé- rides (mg%)	Choles- téról (mg%)
Témoins	Solution physiolo- gique 2 ml/kg	Intra- périto- néale et orale	111,62 \pm 3	71,81 \pm 2
"Triton"	200	Intra- veineuse	479,78 \pm 7	198,12 \pm 5
Glycosaminoglycane + "Triton" (200 mg/kg)	20	Intra- péri- tonéale	190,18 \pm 6	151,00 \pm 6
Glycosaminoglycane + "Triton" (200 mg/kg)	40	Intra- péri- tonéale	139,64 \pm 6	116,50 \pm 5
Glycosaminoglycane + "Triton" (200 mg/kg)	100	Orale	320,70 \pm 8	171,30 \pm 7
Glycosaminoglycane + "Triton" (200 mg/kg)	200	Orale	280,75 \pm 7	162,47 \pm 6

TABLEAU 2

dosage des triglycérides et du cholestérol chez des rats "Wistar" pesant 200 ± 10 g et soumis à un traitement après provocation de l'hyperlipémie au moyen de "Triton" en une dose de 200 mg/kg par voie intraveineuse. Le produit à examiner est administré dans un support à base de "Tween".

Composé	Dose (mg/kg)	Mode d'admini- stration	Triglycé- rides (mg%)	Choles- téról (mg%)
Témoins	Solution physiolo- gique (2 ml/kg)	Orale	$111,62 \pm 3$	$71,81 \pm 2$
"Triton"	200	Intra- veineuse	$479,78 \pm 7$	$198,12 \pm 5$
Glycosamino- glycane + "Triton" (200 mg/kg)	50	Orale	$355,82 \pm 10$	$179,31 \pm 7$
Glycosamino- glycane + "Triton" (200 mg/kg)	100	Orale	$210,37 \pm 9$	$130,92 \pm 9$

TABLÉAU 3

Dosage des triglycérides et du cholestérol chez des rats "Wistar" pesant 200 ± 10 g et soumis à un traitement après provocation de l'hyperlipémie au moyen de "Triton" en une quantité de 200 mg/kg par voie intraveineuse. Le produit à examiner est administré dans un support à base de triglycérides.

Composé	Dose (mg/kg)	Mode d'administration	Triglycérides (mg%)	Cholestérol (mg%)
Témoins	Solution physiologique (2 mg/kg)	Orale	$111,62 \pm 3$	$71,81 \pm 2$
"Triton"	200	Intraveineuse	$179,78 \pm 7$	$193,78 \pm 7$
Glycosaminoglycane + "Triton" (200 mg/kg)	50	Orale	$347,82 \pm 9$	$172,36 \pm 0$
Glycosaminoglycane + "Triton" (200 mg/kg)	100	Orale	$202,23 \pm 6$	$116,75 \pm 0$

Activité lipoprotéinolipasique (essai d'Ediol)

Les effets clarificateurs du produit suivant la présente invention ont été étudiés sur des rats albinos mâles "Wistar" d'un poids moyen de 190 ± 10 g suivant Bianchini (P. Bianchini, G. Guidi, B. Osima : "Blood Levels of the Clearing Factor After Administration of a Natural Glucuronoglucosaminoglycan" - Biochem. Expl. Biol. X, (n. 3), 1972).

Les animaux sont choisis au hasard et ils sont divisés en groupes de six que l'on nourrit de la manière habituelle.

(a) Réponse à une seule dose en fonction de la durée

On injecte les préparations pharmaceutiques (c'est-à-dire le dérivé suivant la présente invention et le dérivé suivant Cushing ayant une activité anticoagulante résiduelle de 10 unités U.S.P./mg) par voie intraveineuse en une dose de 10 mg/kg et en un volume de 5 ml/kg dans une solution physiologique.

Après des périodes prédéterminées de 5, 10, 20, 40, 60 et 90 minutes, on soumet les animaux à une anesthésie à l'éther, puis on prélève un échantillon de 5 ml de sang par ponction cardiaque en utilisant une seringue sèche que l'on a préalablement traitée aux silicones. On verse rapidement le sang dans des éprouvettes graduées centrifugées contenant 0,28 ml de citrate de sodium à 20%. On soumet la matière à une centrifugation à une vitesse de 4.000 tours pendant 15 minutes, puis on sépare le plasma clair.

On prépare des éprouvettes contenant 1 ml d'une solution à 0,18% d'une émulsion lipidique qui a été stabilisée ("lipostrate", "Ediol-Calbiochem"), cette émulsion ayant été préalablement filtrée. Dans chaque éprouvette, on dépose un échantillon du plasma à examiner en une quantité de 2 ml. On veille à laisser s'écouler une période d'une minute lors de la préparation de tous les échantillons de telle sorte que l'on puisse effectuer une lecture appropriée exactement après 30 secondes dans chaque cas, ainsi que des lectures ultérieures 15 minutes après incubation du plasma "Ediol" à 25°C.

On effectue les lectures spectrophotométriques de la densité optique du mélange à 600 nm. Pour la détermination de l'activité clarifiante, on règle la lecture de la densité optique à 100, la lecture de la densité optique étant effectuée

après 30 semaines ; elle est habituellement inférieure à 3. L'activité clarifiante est exprimée par un pourcentage de cette dernière lecture, tandis que les lectures ultérieures sont exprimées en ($= \Delta \%$).

Les résultats démontrent que, dans la dose de 10 mg/kg, la valeur $\Delta \%$ atteint un maximum de -27% cinq minutes après l'administration, tandis que le dérivé préparé suivant Cushing et ayant une activité anticoagulante résiduelle de 10 unités U.S.P./mg atteint une valeur maximale de -50% 10 minutes après l'administration. Dans les deux cas, l'activité clarifiante disparaît 40 minutes après l'administration.

(b) Réponse dose/effet

On effectue une autre série d'expériences conformément au procédé décrit ci-dessus selon lequel on administre toujours à des rats et par voie intraveineuse, des doses croissantes de glycosaminoglycanes, soit plus exactement 0,2, 0,3, 0,6, 0,8, 1, 2, 3 et 5 mg/rat. Cinq minutes après l'administration, on tue les animaux et, conformément aux procédés décrits ci-dessus, on trace la courbe dose/effet. Cette courbe aboutit à une détermination d'une valeur DE_{50} (= dose efficace à 50%) égale à 2,3 mg/rat, soit 11,5 mg/kg. La dose efficace minimale est de 0,75 mg/rat, soit 3,75 mg/kg avec une réduction linéaire allant jusqu'à 2,5 mg/rat.

Sur la base des essais décrits ci-dessus, on peut conclure que l'indice thérapeutique du produit de la présente invention se situe entre 550 et 1.700, soit manifestement une valeur moins favorable que l'indice thérapeutique du dérivé préparé suivant Cushing, lequel est de 700-2300.

Lorsqu'on compare l'activité clarifiante du glycosaminoglycane et du produit de Cushing, on aboutit à la conclusion selon laquelle l'activité clarifiante du produit de la

présente invention est égale à la moitié de celle du produit de Cushing. En réalité, Cushing stipule que la dose thérapeutique se situe dans l'intervalle de 0,5 à 5 mg/kg et que la dose optimale est comprise entre 1 et 3 mg/kg, soit un intervalle de 70 à 210 mg du poids du corps.

En vue d'exercer une activité clarifiante lors d'une thérapie pratiquée par voie parentérale, dans le cas du glycosaminoglycane, la dose optimale se situe entre 2 et 10 mg/kg, soit entre 140 et 700 mg du poids du corps. Cette conclusion est également basée sur les résultats obtenus au cours des expériences de dyslipidémie provoquée par "Triton" chez les rats.

Lorsqu'on compare les deux préparations concernant la dose optimale vis-à-vis du poids du corps et en considérant que l'activité anticoagulante du dérivé de Cushing est de 10 unités U.S.P./mg, tandis que l'activité anticoagulante du glycosaminoglycane est de 0,05 unité U.S.P./mg, on aboutit à la conclusion qu'un traitement effectué avec ce dernier produit donne une activité anticoagulante se situant entre 7 et 35 unités U.S.P./poids du corps/administration, tandis que la thérapie pratiquée avec le dérivé de Cushing donne une activité anticoagulante se situant entre 700 et 2.100 unités U.S.P./poids du corps/administration.

Les résultats ci-dessus font ressortir de toute évidence l'avantage résultant du plus faible risque d'hypo-coagulabilité, en particulier, si l'on considère que le prolongement de la thérapie peut provoquer une hypocoagulabilité et que ce risque est moindre avec le produit suivant la présente invention.

Cet avantage s'accroît du fait que l'absorption par voie orale du glycosaminoglycane est telle que les teneurs en triglycérides et en cholestérol du sang sont sensiblement

réduites, cette caractéristique rendant une thérapie par voie orale intéressante.

Résultats de pharmacologie clinique

On a administré le glycosaminoglycane par voie intraveineuse et à jeun dans les doses indiquées ci-après, en solution dans 6 ml d'eau distillée exempte de pyrogènes, à des sujets volontaires sains de quatre groupes :

Groupe I : 6 sujets (3 masculins, 3 féminins) âgés de 25 à 35 ans. Dose : 90 mg, soit 1,3-1,6 mg/kg du poids du corps.

Groupe II: 6 sujets masculins âgés de 35 à 50 ans. Dose : 100 mg, soit 1,3-1,5 mg/kg ;

Groupe III : les 6 sujets du groupe II, 3 semaines après le premier traitement. Dose : 300 mg, soit 3,9-4,5 mg/kg.

Groupe IV : 6 sujets (4 masculins, 2 féminins) âgés de 50 à 60 ans. Dose : 150 mg, soit 1,9-2,5 mg/kg.

Au moment 0, on prélève le sang pour pratiquer les déterminations de base et, immédiatement après, on administre le glycosaminoglycane. On procède à des prélèvements ultérieurs de sang aux moments suivants : 5 minutes/10 minutes/30 minutes/60 minutes.

On effectue les déterminations en partie sur du plasma traité au citrate et, en partie, sur du sang "complet". Centrifugation à 3.000 tours/minute pendant 15 minutes.

Déterminations : activité lipasémique (LPL, exprimée en $\Delta \%$) suivant l'essai précité d'Ediol ; glycérine libre (exprimée en mM/litre de plasma), acides gras non estérifiés (exprimés en meq/litre de plasma), durée de thrombine partielle (en secondes) suivant les méthodes cliniques normales.

RESULTATSGROUPE I

Moments	Activité lipasémique (moyenne)	Glycérine libre (moyenne)	Acides gras non estérifiés (moyenne)
0 minute	92,53	0,062	0,462
5 minutes	61,39	0,193	0,683
30 minutes	76,99	0,119	0,583
60 minutes	88,59	0,081	0,474

Remarques :

- 1) L'activité lipasémique maximale apparaît déjà 5 minutes après l'administration du glycosaminoglycane avec une réduction de 33,6% du trouble d'Ediol à 600 nm.
- 2) Toujours à 5 minutes, on observe un accroissement de plus de 200% de la teneur en glycérine libre ; à 60 minutes, cet accroissement est nettement plus faible, mais toujours présent.
- 3) A nouveau à 5 minutes, les teneurs en acides gras non estérifiés sont accrues d'environ 100% comparativement au moment 0.

GROUPE II

Moments	Activité lipasémique (moyenne)	Glycérine libre (moyenne)	Acides gras non estérifiés (moyenne)	Thrombine partielle (secondes)
0 minute	92,82	0,084	0,408	24
10 minutes	70,82	0,206	0,899	25
30 minutes	78,50	0,114	0,550	25
60 minutes	84,49	0,084	0,521	24

Remarques :

- 1) 10 minutes après l'administration, on observe les accroissements les plus élevés de l'activité lipasémique (24%), de la teneur en glycérine libre (~150%) et de la teneur en acides gras non estérifiés (~120%).
- 2) La valeur de thrombine partielle reste pratiquement égale à la valeur de base pour tous les sujets.

CROUPE III

Moments	Activité lipasémique (moyenne)	Glycérine libre (moyenne)	Acides gras non estérifiés (moyenne)	Thrombine partielle (secondes)
0 minute	99,49	0,104	0,159	26
10 minutes	50,67	0,440	0,921	26
30 minutes	50,68	0,405	0,681	25
60 minutes	68,59	0,262	0,617	26

Remarques :

- 1) A la dose de 300 mg (toujours après 10 minutes), on observe les activités maximales qui sont nettement supérieures aux précédentes : 49% pour l'activité lipasémique ; environ 300% pour la teneur en glycérine libre et environ 450% pour la teneur en acides gras non estérifiés. Les valeurs restent remarquablement significatives également après 60 minutes.
- 2) Les valeurs de thrombine partielle sont pratiquement constantes et égales à la valeur de base.

GROUPE IV

Moments	Activité lipasémique (moyenne)	Glycérine libre (moyenne)	Acide gras non estérifiés (moyenne)	Thrombine partielle (secondes)
0 minute	99,4	0,0599	0,410	24
10 minutes	72,78	0,1084	0,814	23
30 minutes	74,63	0,0740	0,780	24
60 minutes	81,44	0,0494	0,656	24

Les résultats sont analogues à ceux des groupes précédents.

De plus, pour les groupes II, III et IV, on a déterminé le lipidogramme (β -lipoprotéines, pré- β -lipoprotéines, kilomikrons) par néphélémétrie ; les valeurs sont exprimées en mg/100 ml de sérum. On a relevé les observations suivantes :

- chez les sujets du groupe II, la valeur des β -lipoprotéines au moment 0 (425-450) a diminué à ~ 250 après 10 minutes et, par conséquent, elle se situait entre 250 et 300 après 60 minutes, tandis que les valeurs en pré- β -lipoprotéines et en kilomikrons sont restées pratiquement constantes (270-280 et respectivement 11,7-12,2).
- Groupe III : dans ce cas, la valeur de base des β -lipoprotéines a diminué à environ 120 après 10 minutes et elle était de 150-220 après 60 minutes. On n'a observé aucune variation importante pour les valeurs en pré- β -lipoprotéines et en kilomikrons.
- Groupe IV : la valeur des β -lipoprotéines a diminué de 190-220 (moment 0) à 120-130° après 10 minutes et elle est restée à ce niveau également après 60 minutes. Les valeurs en pré- β -lipoprotéines sont restées pratiquement inchangées avec une légère diminution des valeurs en kilomikrons.

REVENDICATIONS

1. Dérivé succinylique d'héparine désulfatée, caractérisé en ce que la teneur en N-sulfate est inférieure à 10% comparativement à l'héparine constituant la matière de départ, tandis que le radical succinyle est présent en une quantité supérieure à 0,6 par unité de disaccharide.

2. Dérivé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le radical succinyle est présent en une quantité d'environ 1,2 par radical de disaccharide.

3. Dérivé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que l'activité anticoagulante est inférieure à 0,5 unité internationale/mg.

4. Procédé de préparation d'un dérivé succinylique d'héparine désulfatée, dérivé dans lequel la teneur en groupes N-sulfate est inférieure à 10% comparativement à l'héparine constituant la matière de départ, tandis que le radical succinyle est présent en une quantité supérieure à 0,6 par unité de disaccharide, caractérisé en ce qu'il consiste à hydrolyser de l'héparine avec un acide fort au moins 0,1N à une température supérieure à la température ambiante, puis faire réagir le produit de cette hydrolyse avec de l'anhydride succinique à un pH supérieur à 7.

5. Procédé suivant la revendication 4, caractérisé en ce que la température se situe entre 70 et 100°C, tandis que l'on effectue l'hydrolyse pendant une période de plus de 3 heures.

6. Procédé suivant la revendication 4, caractérisé en ce qu'on utilise un acide fort au moins 0,5N.

7. Procédé suivant la revendication 4, caractérisé en ce que le rapport pondéral entre l'anhydride succinique et le produit d'hydrolyse se situe entre 1:1 et 5:1.

8. Procédé en vue de réduire la teneur en lipides du sang "in vivo" chez un sujet vivant dont le sang a une forte teneur en lipides, caractérisé en ce qu'il consiste à administrer, à ce sujet, un composé suivant la revendication 1.

9. Procédé suivant la revendication 8, caractérisé en ce que le sujet vivant est un être humain atteint de dyslipidémie.

10. Composition pharmaceutique pour la thérapie d'états de dyslipidémie, caractérisée en ce que, comme ingrédient actif, elle comprend le dérivé succinylque d'héparine suivant la revendication 1.

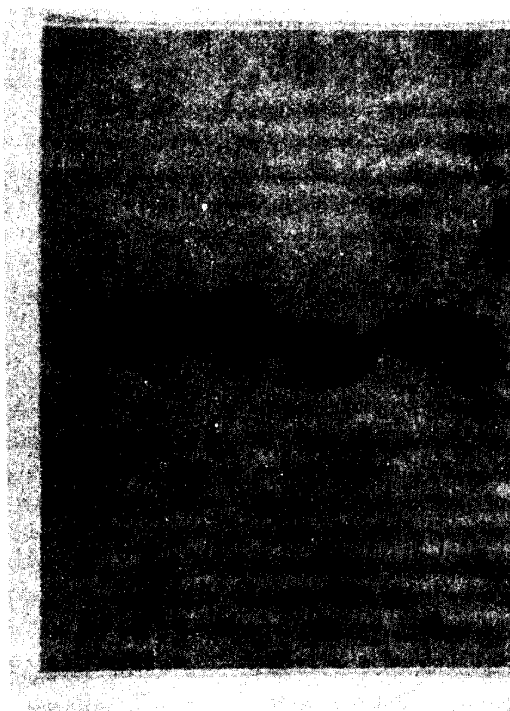
11. Composition suivant la revendication 10, sous une forme de dosage unitaire approprié pour une administration par voie parentérale.

12. Composition suivant la revendication 11, caractérisée en ce que la forme de dosage unitaire se situe entre 0,5 et 40 mg/kg du poids du corps.

13. Composition suivant la revendication 10 sous une forme de dosage unitaire appropriée pour une administration par voie orale.

14. Composition suivant la revendication 13, caractérisée en ce que la dose unitaire se situe entre 30 et 300 mg/kg du poids du corps.





+



-

