



MINISTÈRE DES AFFAIRES ÉCONOMIQUES

N° 885.540

Classif. Internat.: C08B/C07G/A61K

Mis en lecture le: 02-02-1981

Le Ministre des Affaires Économiques,

Vu la loi du 24 mai 1854 sur les brevets d'invention;

Vu la Convention d'Union pour la Protection de la Propriété Industrielle;

Vu le procès-verbal dressé le 3 octobre 19780 à 15 h. 40

au Service de la Propriété industrielle;

ARRÊTE :

Article 1. — Il est délivré à la Sté dite : BIOMED RESEARCH, INC.,
8733 Beverly Blvd. , 4 th Floor, Los Angeles, California
900 (Etats-Unis d'Amérique),

repr. par l'Office Kirkpatrick-G.C. Plucker à Bruxelles,

un brevet d'invention pour: Procédé de préparation de sulfate de chondroïtine et composition pharmaceutique contenant ce dernier,

qu'elle déclare avoir fait l'objet de demandes de brevet déposées aux Etats-Unis d'Amérique le 5 octobre 1979, n° 82.045 et le 4 février 1980, n° 118.211 au nom de P.G. Rucker dont elle est l'ayant cause.

Article 2. — Ce brevet lui est délivré sans examen préalable, à ses risques et périls, sans garantie soit de la réalité, de la nouveauté ou du mérite de l'invention, soit de l'exactitude de la description, et sans préjudice du droit des tiers.

Au présent arrêté demeurera joint un des doubles de la spécification de l'invention (mémoire descriptif et éventuellement dessins) signés par l'intéressé et déposés à l'appui de sa demande de brevet.

Bruxelles, le 31 octobre 19780

PAR DÉLÉGATION SPÉCIALE:

Le Directeur

L. SALPETEUR

005540

MÉMOIRE DESCRIPTIF

DÉPOSÉ A L'APPUI D'UNE DEMANDE

DE

BREVET D'INVENTION

FORMÉE PAR

BIOMED RESEARCH, INC.

p o u r

Procédé de préparation de sulfate de chondroïtine et composition
pharmaceutique contenant ce dernier.

Demandes de brevets aux Etats-Unis d'Amérique n° 82.045 du
5 octobre 1979 et n° 118.211 du 4 février 1980 en faveur de
P.G. RUCKER.

PG.4F

149-103

Dans les brevets US 3 895 106 et 3 895 107, on décrit un procédé de traitement pour inhiber le développement des lésions d'athérosclérose chez les animaux de l'espèce mammifère, favoriser le développement de la circulation collatérale dans les régions du coeur irriguées par les branches des artères coronaires et inhiber l'apparition de troubles cardiaques épisodiques tels que l'infarctus du myocarde, l'insuffisance coronarienne aiguë avec une ischémie aiguë du myocarde chez les sujets humains, atteints de maladie cardiaque avec ischémie, ce procédé consistant en une administration orale essentiellement régulière et prolongée par les mammifères, d'une quantité efficace d'un sulfate de chondroïtine A, (en abrégé CSA), d'un sulfate de chondroïtine C (en abrégé CSC) ou de mélanges de ces deux sulfates, biologiquement et physiologiquement "actifs", l'activité se manifestant par au moins une prolongation de 80 % du temps de formation d'un thrombus plasmique 6 à 12 heures après l'administration chez des lapins, tel que décrit dans la méthode de la boucle de Chandler (Chandler loop method").

Dans une étude récemment complétée, comparant le sulfate de chondroïtine administré par voie orale avec un placebo dans la prévention d'une thrombose post-opératoire des veines profondes, on a conclu que le CSA administré par voie orale diminue l'apparition de thrombose post-opératoire des veines profondes (DVT), tel qu'on peut le détecter par le test au fibrinogène radioactif chez des patients ayant subi des opérations chirurgicales quelconques et chez des patients ressortissant du domaine gynécologique. De plus, cette étude a montré qu'il n'existe aucune complication évidente du fait de l'administration du médicament.

Selon ces brevets, les CSA et CSC "actifs" sont obtenus par digestion et solubilisation du matériau de la source broyé et dégraissé, tel que la trachée de bovin et le cartilage de requin, par exposition prolongée à de la papaine activée par le chlorhydrate de cystéine et le versénate disodi-

que. A la solution contenant différents matériaux étrangers avec le CSA et/ou le CSC actif(s) désiré(s), on ajoute alors deux volumes d'acétone qui précipite le CSA et/ou le CSC désiré(s).

5 Ce procédé antérieur présente plusieurs inconvénients dans la pratique. La précipitation est incomplète à moins d'utiliser de grands volumes d'acétone. Mais l'utilisation de grands volumes d'acétone est inconmode, dangereuse et gênante, et même au mieux, au moins une partie du CAS et/ou du
10 CSC actif(s) désiré(s) n'est pas précipitée et se trouve perdue. La perte est d'autant plus importante que le volume d'acétone est réduit pour faciliter la manipulation.

La Demanderesse a découvert que ces problèmes et difficultés peuvent être presque entièrement supprimés en utilisant
15 certains agents complexants au lieu de l'acétone. Plus précisément, la Demanderesse a trouvé que des agents complexants tels que des composés d'ammonium quaternaire forment sélectivement des complexes insolubles dans l'eau avec le CSA et le CSC "actifs", entraînant une précipitation essentiellement
20 quantitative du CSA et du CSC, et en même temps laissant la totalité des autres substances indésirées dans le liquide surnageant.

Conformément à l'invention, il n'est plus nécessaire de manipuler de grands volumes d'acétone et de matériaux semblables. De plus, il est tout à fait surprenant que ces complexes se forment, et qu'ils se forment sélectivement, avec le
25 CSA et/ou le CSC "actif(s)". Bien que n'étant aucunement lié par la théorie, on pense que les agents complexants et le CSA et/ou le CSC "actif(s)" ont des charges opposées et sont donc attirés l'un vers l'autre pour former un certain type de liaison. En tout cas, la liaison a pour effet d'entraîner une précipitation totale. La liaison peut ensuite être facilement rompue par une base telle que l'hydroxyde de sodium et/ou une solution saline hypertonique pour donner le(s) CSA et/ou CSC
35 "actif(s)" libre(s). La Demanderesse pense que ce procédé per-

fectionné représente un progrès significatif dans la préparation de ce médicament important.

En résumé, l'invention concerne un procédé perfectionné pour la préparation d'un sulfate de chondroïtine biologiquement et physiologiquement "actif", de qualité pharmaceutique, notamment le sulfate de chondroïtine A, le sulfate de chondroïtine C et des mélanges de ces deux sulfates à partir d'un matériau de départ, ce procédé consistant à former une solution du matériau de départ contenant le matériau "actif", à y ajouter un agent complexant pour former un précipité qui est un complexe insoluble dans l'eau, du matériau actif et de l'agent complexant et à scinder le complexe pour recueillir le matériau "actif" de qualité pharmaceutique.

L'invention a pour but de fournir un procédé perfectionné pour la préparation de CSA et/ou de CSC "actif(s)".

L'invention a encore pour but de fournir un moyen plus sûr et plus commode pour recueillir et isoler le CSA et/ou le CSC actif(s).

L'invention a encore pour objet de fournir un procédé pour isoler le CSA et/ou le CSC "actif(s)" d'une manière virtuellement quantitative.

Dans un autre aspect, l'invention a pour but de préparer un nouveau complexe de CSA et/ou de CSC qui est obtenu sous forme d'un précipité dans une solution aqueuse et peut être facilement scindé après récupération du précipité pour donner le CSA et/ou le CSC "actif(s)" libre(s).

D'autres buts et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture de la description ci-après.

L'invention est applicable au CSA et/ou au CSC "actif(s)" provenant de toutes les sources usuelles telles que la trachée de bovin, la trachée des baleines et requins, la trachée de porc, et en fait, de façon générale à tous les tissus de mammifères. Le traitement initial du matériau brut provenant d'un animal ou d'un poisson, tel que livré par des conserveries et autres, consiste à éliminer la graisse et à ha-

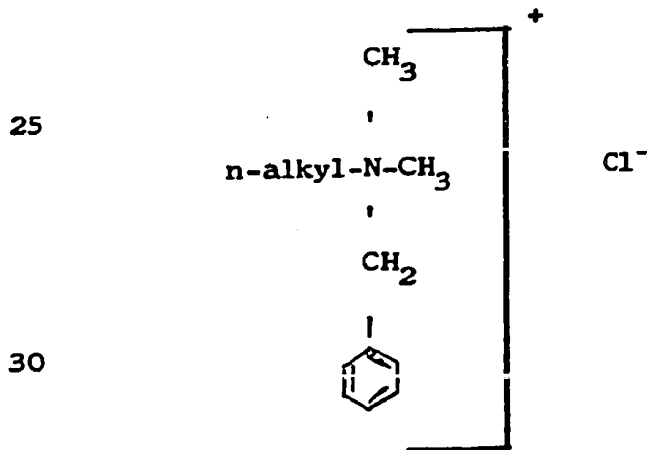
7

cher ou broyer le tissu trachéal et/ou d'autres tissus.

Le matériau de départ finement divisé est alors digéré en utilisant de la pepsine, de la papaïne ou d'autres enzymes protéolytiques pour éliminer les protéines. Simultanément ou ultérieurement, l'élimination des protéines et la solubilisation du CSA et du CSC peuvent avoir lieu au moyen de bases fortes telles que l'hydroxyde de sodium et l'hydroxyde de potassium. L'acide chlorhydrique concentré est également utilisable à cet effet.

Dans tous les cas, on obtient une solution aqueuse du CSA et/ou du CSC. Cette solution contient d'autres constituants indésirables ou bien souvent nuisibles, provenant de la scission chimique du matériau de départ et le but de l'invention consiste à séparer et extraire le CSA et/ou le CSC "actif(s)" de ces constituants indésirables ou nuisibles.

Conformément à l'invention, un complexe insoluble, nouveau et particulier, de CSA et/ou de CSC et d'agents complexants est formé à partir de la solution aqueuse. Les agents complexants sont, par exemple, le chlorure de cétyle pyridinium commercialisé sous la marque déposée "Barquat" par Hexcel Specialty Chemicals ou un chlorure de n-alkyl diméthyl benzyl ammonium qui répond à la formule :



dans laquelle le groupe alkyle est surtout un groupe en C₁₂ à C₁₈. Ces matériaux sont commercialisés sous la marque déposée "Marqual" par Mason Chemical Company.

7

Comme autres agents complexants, également utilisables, pour le CSA et/ou le CSC "actif(s)", on peut citer diverses résines échangeuses d'anions telles que "Dowex 1-X" de Dow Chemical Company. Ces matériaux sont décrits dans les brevets
 5 US 2 591 573 et 2 591 574. De façon générale, ces résines sont des copolymères de benzène et de divinylbenzène réticulés contenant des groupes alkyl amine quaternaire ou le substituant alkyle est un alkyle inférieur.

Après la précipitation et la récupération du complexe,
 10 ce dernier peut être scindé par contact avec une base douce et/ou une solution saline hypertonique pour donner le CSA et/ou le CSC "actif(s)" libre(s). Ce matériau est directement utilisable dans une gélule, un comprimé; etc. pour une administration orale aux êtres humains, en particulier comme agent
 15 anti-thrombose. La posologie est celle décrite dans les brevets cités ci-dessus. Si on désire obtenir le médicament sous une forme administrable par voie parentérale, le CSA et le CSC "actifs" libres peuvent être ensuite traités par des agents oxydants tels que le permanganate de potassium pour éli-
 20 miner toute trace de constituants étrangers oxydables.

L'exemple non-limitatif suivant est donné à titre d'illustration de l'invention. Dans cet exemple, les indications de parties et de pourcentages s'entendent en poids, sauf mention contraire.

25 EXEMPLE

On hache 45,3 kg de trachée de boeuf préparée en fragments de 6,45 cm² et on les charge dans une cuve contenant environ 189 l d'eau désionisée. On ajuste le pH vers 4,5 en ajoutant environ 400 ml d'acide acétique glacial. On agite la
 30 suspension résultante en élevant le contenu de la cuve jusqu'à une température voisine de 50 °C. On ajoute 566 g de pep-sine et on poursuit l'agitation pendant 30 minutes. On ajoute encore dans la cuve 189 l d'eau désionisée et on poursuit l'agitation de façon modérée pendant 12 heures à 50 °C jus-
 35 qu'à ce que le cartilage trachéal soit exempt de tissu con-

jonctif. On élève alors la température de la suspension à 80 °C et une couche de graisse se forme sur le dessus du liquide. On sépare la liqueur de digestion au moyen d'une centrifugeuse à panier et on la jette.

- 5 On lave deux fois les solides restants avec 189 l d'eau chaude (60-80 °C). On prépare une solution d'hydroxyde de sodium en ajoutant 679 g de NaOH à 18,9 l d'eau désionisée dans une cuve. On ajoute les solides lavés deux fois à la solution d'hydroxyde de sodium et on ajuste le volume à 45,4 l avec de
- 10 l'eau désionisée et on ajuste le pH vers 9-10. On agite le contenu de la cuve pendant 12 heures à 37 °C. On ajuste alors le pH à 6,5 avec de l'acide acétique glacial. On chauffe le liquide à l'ébullition, puis on le laisse refroidir. On filtre le liquide au moyen d'une centrifugeuse à panier et on re-
- 15 cueille le filtrat. Au filtrat recueilli, on ajoute 679 g de chlorure de cétyle pyridinium, puis on agite pendant 30 minutes. On laisse le liquide au repos pendant 16 heures. Il se forme un précipité. On décante le liquide surnageant et on collecte le précipité par centrifugation continue dans une
- 20 centrifuge Sharples. On verse le précipité collecté dans 18,9 l d'hydroxyde de sodium 0,5 N. On ajoute alors 37,8 l de méthanol et on laisse reposer pendant 12 heures à la température ambiante. On collecte de nouveau le précipité formé par centrifugation continue et on lave avec 18,9 l de méthanol. On
- 25 dissout le précipité dans 7,57 l d'eau distillée, on ajuste le pH à 7,0 avec de l'acide acétique glacial et on ajoute 113 g de chlorure de sodium avant d'agiter. On ajoute 15,1 l de méthanol et on poursuit l'agitation pendant 15 minutes. Après un repos de 12 heures à la température ambiante, il se forme
- 30 un précipité qu'on collecte par centrifugation. On sèche le précipité sous vide. L'analyse démontre que le précipité est essentiellement du CSA. Le matériau manifeste une prolongation du temps de formation d'un thrombus plasmique 6 à 12 heures après l'administration à des lapins, selon le procédé de la
- 35 boucle de Chandler, de plus de 80 %.

Dans l'étude suivante, tous les sujets présentaient une maladie vasculaire périphérique d'occlusion artérielle, décelée par des moyens cliniques, avec une claudication intermittente et des signes d'altération de la circulation sanguine artérielle dans l'un des deux ou dans les deux membres. Chez tous les sujets admis, l'état clinique et l'activité de la maladie étaient restés relativement stables pendant les six mois précédents. Aucun des sujets n'avait reçu d'anticoagulant ou de traitement thrombolytique pendant les six mois précédents. De plus, les sujets qui avaient reçu des médicaments vasodilatateurs, les avaient reçus à une dose constante pendant les 6 à 8 mois précédents.

Les sujets qui souffraient d'autres troubles restreignant leur activité tels qu'une maladie cardiaque, étaient exclus, ainsi que les sujets atteints de diabète sucré et les sujets ayant subi une chirurgie vasculaire concernant l'aorte abdominale, les artères iliaques, les artères fémorales superficielles et profondes et les branches terminales de ces artères dans les membres inférieurs.

On a d'abord rassemblé les données cliniques suivantes : âge, poids, taille, habitudes de fumer, présence de veines variqueuses, sévérité de la douleur du mollet au repos et à la marche. On a divisé les patients selon l'âge, le sexe et l'habitude de fumer des cigarettes et on les a répartis dans un groupe témoin (placebo) ou dans un groupe de traitement actif (le CSA "actif" préparé selon l'exemple précédent).

La substance d'essai active était sous la forme de comprimés contenant 500 mg de CSA "actif". Les comprimés de placebo avaient les mêmes forme, couleur et consistance que les comprimés de substance active. Après l'établissement des groupes, les patients recevaient soit la substance active, soit le placebo selon le régime suivant :

Pendant les 5 premiers jours du traitement : 12 comprimés par jour en quatre doses égales de 3 comprimés.

Du sixième jour au dixième jour du traitement : 8 com-

A partir du onzième jour du traitement pendant une période de 13 semaines : 4 comprimés par jour en quatre doses égales.

5 La durée du traitement était de 14 semaines, les patients étant examinés toutes les deux semaines pendant les six premières semaines, puis chaque mois ensuite jusqu'à la fin du traitement. Mais avant de commencer le traitement, les patients étaient examinés selon le programme suivant :

Au cours de tous ces examens, on notait l'état général
15 du patient. La sévérité clinique de la claudication et l'état
de la peau étaient classés en faibles, modérés ou sévères. La
distance maximale individuelle de marche, que chaque patient
pouvait parcourir, était soigneusement enregistrée en mètres
et tout symptôme associé était noté.

1. Pléthysmographie segmentée de l'un ou des deux membres inférieurs.

3. Temps de l'apparition de la douleur du mollet lors d'une marche à vitesse normale.

4. Les mesures subjectives suivantes, quant à une réponse clinique :

30 Nombre d'attaques de la douleur du mollet à la marche pendant le jour précédent l'examen.

Sévérité de la douleur du mollet mesurée sur une échelle analogique visuelle.

Nombre d'apparitions de la douleur du mollet au repos
35 pendant la semaine précédant l'examen.

Evaluation des changements d'après une échelle analogique visuelle.

Type et fréquence des effets secondaires mentionnés :

5. Mesures de laboratoire :

5 (a) Hématologie : concentration en hémoglobine, valeur de l'hématocrite, concentration globulaire moyenne en hémoglobine, numération des globules blancs et numération différentielle, numération des plaquettes, numération des réticulocytes, et ESR.

10 (b) Taux plasmatiques de fibrinogène (à jeun).

(c) Taux sériques de cholestérol, de lipoprotéines et de triglycérides (à jeun).

(d) Mécanismes de coagulation du sang : temps de coagulation du plasma par la thrombine ; temps de lyse de l'euglobuline et temps d'agrégation des plaquettes.

15 L'étude a été faite sur 41 patients dont 22 dans le groupe CSA actif et 19 dans le groupe témoin placebo. Tous les patients souffraient d'une maladie bilatérale.

Les données cliniques, de laboratoire et de coagulation
20 concernant les 41 patients choisis pour les essais sont rassemblées dans le tableau 1.

TABLEAU 1

Données cliniques et de laboratoire concernant
les deux groupes de patients choisis pour les essais :
25 moyenne $\pm$ erreur standard moyenne.

	<u>Groupe "CSA"</u>	<u>Groupe placebo</u>
Nombre de cas	22	19
Age (années)	62 $\pm$ 1,09	61 $\pm$ 0,94
Fumeurs de cigarettes (% du groupe)	77,3	73,7
30 % de surcharge pondérale par rapport à la taille	31,8	36,8
Distance de marche (mètres)	55,4 $\pm$ 3,9	55,9 $\pm$ 4,7
Douleur du mollet au repos (nombre par semaine)	11,8 $\pm$ 1,9	11,4 $\pm$ 2,0

TABLEAU 1 (suite)

		<u>Groupe "CSA"</u>	<u>Groupe placebo</u>
	Douleur du mollet (analogue visuel/mm)	45,6 $\pm$ 4,5	50,1 $\pm$ 5,7
5	Fibrinogène (g/l)	3,49 $\pm$ 0,16	3,37 $\pm$ 0,13
	Temps de coagulation du plasma par la thrombine (% du temps normal)	101 $\pm$ 1,52	103 $\pm$ 1,88
	Temps de lyse de l'euglobuline (mn)	327 $\pm$ 5,23	330 $\pm$ 4,24
10	Temps d'agrégation des pla- quettes (s)	639 $\pm$ 3,2	641 $\pm$ 4,2
	Temps de céphaline (s)	40,1 $\pm$ 0,34	41,3 $\pm$ 0,41
	Cholestérol (mg/dl)	295,1 $\pm$ 2,8	297,3 $\pm$ 3,48
	Particules "S" (mg/dl)	535,7 $\pm$ 6,1	539,4 $\pm$ 5,6
15	Débit sanguin maximal au mollet (ml/100 ml de tissu/mn)	20,8 $\pm$ 1,91	19,4 $\pm$ 1,8

Les différences entre les groupes ne sont pas significatives au niveau de 0,05.

Les deux groupes étaient comparables quant à la répartition des âges, au rapport des sexes, au nombre de fumeurs et à la quantité de cigarettes fumées et aux résultats des mesures subjectives et objectives des réponses cliniques.

L'amélioration de la distance de marche montrée par chacun des groupes est indiquée dans le tableau 2.

TABEAU 2 : AMELIORATION DE LA DISTANCE DE MARCHÉ

Thérapie	Nombre de patients	Distance de marche en mètres (moyenne $\pm$ erreur standard moyenne)					
		Avant essai	Semaine zéro	Deuxième semaine	Quatrième semaine	Sixième semaine	Dixième semaine
"CSA"	22	55,4 $\pm$ 3,9	52,6 $\pm$ 4,1	53,1 $\pm$ 3,8	78,0 $\pm$ 5,7*	81,2 $\pm$ 4,9*	86,7 $\pm$ 5,1*
Placebo	19	55,9 $\pm$ 4,7	53,8 $\pm$ 4,3	54,5 $\pm$ 4,9	49,3 $\pm$ 4,5*	49,6 $\pm$ 5,0*	50,3 $\pm$ 4,9

* Amélioration significative dans les groupes "CSA" ;

$t_{ind} = 3,98$; $p < 0,01$

NOMBRE DE PATIENTS DONT LA DISTANCE DE MARCHÉ S'EST AMELIOREE

Thérapie	Cas totaux	NOMBRE DE PATIENTS DONT LA DISTANCE DE MARCHÉ S'EST AMELIOREE					
		Semaine zéro	Deuxième semaine	Quatrième semaine	Sixième semaine	Dixième semaine	Quatorzième semaine
"CSA"	22	2(9,1%)	6(27,3%)	11(50,0%)	14(63,6%)	15(68,2%)	14(63,6%)
Placebo	19	2(10,5%)	3(15,8%)	2(10,5%)	4(21,1%)	3(15,8%)	4(21,1%)

A la quatrième semaine de traitement on a observé une amélioration significative de la distance de marche montrée par le groupe traité au sulfate sodique de chondroïtine ($t_{ind} = 3,98$; $P < 0,01$). Cette amélioration a persisté pendant les dix autres semaines de l'étude. On n'a enregistré aucune amélioration significative de la distance de marche dans le groupe traité au placebo.

Dans le tableau 2, on a également indiqué le nombre de patients dont la distance de marche s'était améliorée. Par définition arbitraire, un patient "dont l'état ne s'est pas amélioré" ne montre aucune augmentation de la distance de marche ou seulement une amélioration minimale (par exemple une claudication à une distance initiale de 50 mètres reculant à 65 mètres). Les patients "dont l'état s'est amélioré" montrent une nette augmentation de la distance de marche (par exemple une distance initiale de 50 mètres portée à 80-90 mètres). D'après les données du tableau 2, il semblerait que les patients "dont l'état s'est amélioré" montrent une augmentation intermédiaire de la distance de marche aux quatrième, sixième et dixième semaines de la période de traitement, indiquant une amélioration progressive.

Dans le tableau 3, on a rapporté les changements du débit sanguin (réponse du débit maximal dans le mollet) dans les deux groupes de patients.

TABLEAU 3
Changements du débit sanguin (réponse du débit maximal dans le mollet)
dans les deux groupes de patients

Thérapie	Débit maximal du sang dans le mollet (ml/100 ml de tissu/mn)			
	Avant essai	Semaine zéro	Quatrième semaine	Dixième semaine
"CSA"	20,8±1,91	19,3±1,76	27,4±1,56*	35,6±1,81*
Placebo	19,4±1,82	20,4±1,90	18,6±1,73	21,3±1,52
				34,9±1,90*
				20,1±1,87

* Augmentation significative du débit moyen dans le groupe "CSA" ; P 0,01

005540

On peut voir qu'à la quatrième semaine du traitement, le débit sanguin moyen a considérablement augmenté dans le groupe traité au sulfate sodique de chondroïtine, augmentation qu'on a constaté également au dixième et quatorzième 5 semaines de l'étude.

Les évaluations des sujets quant aux changements concernant la sévérité de la douleur du mollet, mesurée par une échelle analogique visuelle sont rapportées dans le Tableau 4.

7

Evaluations des sujets quant aux changements concernant la sévérité de la douleur du mollet en adoptant une échelle analogique visuelle sur 10 cm

Valeur de t ind :

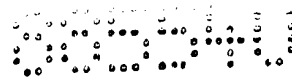
Groupe "CSA" :

Réponse par rapport

à la semaine zéro

Amélioration significative dans le groupe "CSA" seulement

**** P < 0,01 ; ** P < 0,001.**



On note une amélioration importante uniquement dans le groupe "CSA", qui devient évidente après la 6ème semaine de traitement. Les données de laboratoire et de coagulation, obtenues dans l'étude, dans les deux groupes de traitement, 5 sont données dans le tableau 5.

7

Données de laboratoire et de coagulation dans les deux groupes de traitement pendant l'étude (moyenne + écart-type)

14

Diminution importante par rapport aux valeurs de la ligne de base :

* 0,01 < P < 0,02 ; ** P < 0,01

On a constaté des réductions significatives des concentrations moyennes en cholestérol sérique et des taux moyens de fibrinogène dans le groupe "CSA" à la 14ème semaine, par rapport à la valeur de la ligne de base. Aucun autre changement important n'a été enregistré pour les autres mesures entreprises dans cette étude.

Les comprimés de CSA "actif" ont donné des résultats bien meilleurs que le placebo, quant aux statistiques chez des patients souffrant de claudication intermittente, avec une amélioration considérable de la distance de marche chez les patients ayant reçu du CSA "actif". Le CSA "actif" administré par voie orale était bien toléré et n'a provoqué aucun effet secondaire important.

Dans cette étude, l'administration orale de CSA "actif" n'a été associée à aucun changement significatif du temps de coagulation du plasma par la thrombine et du temps d'agrégation des plaquettes.

De nouveau, on ne peut pas définir les modes possibles d'action du CSA "actif", mais la réduction importante des taux de fibrinogène plasmatique et des taux de cholestérol sérique peut être considérée comme très importante.

On a donc décidé d'entreprendre un essai vérifié pour évaluer l'efficacité du CSA "actif" préparé tel que décrit ci-dessus, dans la prévention de la thrombose post-opératoire des veines profondes.

L'étude a porté sur 140 patients subissant soit une chirurgie gynécologique majeure, soit des opérations chirurgicales générales choisies. Les patients qui ont subi une chirurgie de la jambe ou de la hanche étaient exclus de l'étude.

On a déterminé les données cliniques suivantes : âge, poids, taille, durée du séjour à l'hôpital (stage) avant l'opération, taux pré-opératoires d'hémoglobine, habitudes de fumer, présence de veines variqueuses à l'examen clinique, historique de la maladie thrombo-embolique veineuse, nature de l'opération, et indication si la chirurgie se rapporte à

une maladie bénigne ou maligne. Les patients étaient classés selon l'âge, le sexe et les habitudes de fumer la cigarette et répartis dans un groupe témoin placebo ou dans un groupe de traitement actif. Tous les patients ont reçu une physiothérapie hospitalière de routine et étaient encouragés à se remettre sur pied dès que possible après l'opération.

Le groupe de traitement recevait par voie orale 10 g de CSA "actif" pendant les deux jours précédant l'opération, puis 5 g de CSA "actif" (en dose divisée) par jour pendant 7 jours après l'opération ou jusqu'à ce que le patient quitte l'hôpital.

Les plaquettes étaient mesurées dans un thrombocmpteur de Colter. La libération du facteur plaquettaire III était mesurée par la méthode de Spaet et Cintron, le fibrinogène déterminé par la méthode de Ratnoff et Menzie et par électro-immunodiffusion, l'anti-thrombine III par la méthode de Howie et al., le facteur VIII par une méthode en un stade de Brecken et Ratnoff, le temps de lyse de l'euglobuline par la méthode de Nilsson et Olow, l'antigène de la fibrine sérique (antigène FR) par la méthode de Merskey et al., le temps de prothrombine par la méthode de Merskey et al., le temps de thrombine par la méthode de Aylward et al., et l'aggrégation des plaquettes à l'adénosine diphosphate, au collagène et à l'adrénaline était mesurée par la méthode de l'aggrégomètre de Bourne et Cross.

Tous les patients ont subi une exploration isotopique pré-opératoire des jambes au moyen de la technique au fibrinogène marqué par le ^{125}I de Kakkar. Une exploration post-opératoire de routine était effectuée les premier, troisième et sixième jours, à moins d'avoir obtenu un comptage particulièrement élevé en débutant l'exploration journalière. Le comptage radioactif en différentes positions sur les jambes était exprimé en pourcentage direct du comptage cardiaque. On a considéré que les patients étaient atteints d'une thrombose des veines profondes lorsqu'une augmentation de 20 % était consta-

tée à la même place sur deux jours différents, ou entre deux sites adjacents, à condition que cette augmentation persiste plus de 24 heures.

Il y avait 70 patients dans le groupe placebo et 70 dans le groupe de traitement actif. Les données cliniques et de coagulation sur les 140 patients avant l'opération sont rassemblées dans le Tableau 6. Dans les deux groupes, les répartitions des âges, le rapport des sexes, et les types d'opérations effectuées étaient comparables. L'incidence dans les deux groupes des divers facteurs qui prédisposent au développement d'une thrombose des veines profondes était comparable.

TABLEAU 6

Données pré-opératoires cliniques et de coagulation dans les groupes de patients étudiés.

	<u>Cas gynécologiques</u>	<u>Groupe actif</u>	<u>Groupe placebo</u>
	Nombre de cas	32	32
	Age (années)	52±3	51±2
20	Fumeurs de cigarettes (% du groupe)	35	37,5
	Stage pré-opératoire (jours)	4±1	4±1
	% de surcharge pondérale par rapport à la taille	12,5	15,6
	Présence de veines variqueuses (% du groupe)	25	18,8
25	Maladie maligne (% du groupe)	6,25	6,25
	Fibrinogène (g/l)	3,03±0,11	2,99±0,10
	Facteur VII (% de la normale)	116±6	114±7
	Temps de lyse de l'euglobuline (mn)	312±21	326±23
30	Antigène FR sérique (µg/l)	7±1	8±1
	Temps de coagulation du plasma par la thrombine (% de la normale)	106±4	104±5
	<u>Cas chirurgicaux généraux</u>		
	Nombre de cas	38	38
35	Age (années)	42±6	44±3

	Groupe actif	Groupe placébo
Cas femelles	12	13
Fumeurs de cigarettes (cas)	13	14
5 Stage pré-opératoire (jours)	2±0,5	2±0,5
% de surcharge pondérale par rapport à la hauteur	10	12,5
Présence de veines variqueuses	11	10
Fibrinogène (g/l)	2,94±0,08	2,96±0,09
10 Facteur VII (% de la normale)	123±8	125±7
Temps de lyse de l'euglobuline (mn)	298±15	296±13
Antigène FR sérique (µg/l)	8 ± 1	7 ± 1
Temps de coagulation du plasma par la thrombine (% de la normale)	103±4	102±3

15 Le tableau 7 montre l'incidence globale d'une thrombose des veines profondes dans les groupes placebo et de traitement. 15 des 25 patients atteints d'une thrombose des veines profondes dans le groupe placebo et 6 des 11 patients atteints d'une thrombose des veines profondes dans le groupe de traitement

20 avaient des explorations bilatérales des jambes positives. Il y a là une différence significative ($P < 0,02$). La considération du type d'opération dans les deux groupes de patients a indiqué une réduction significative de l'incidence d'une

25 thrombose des veines profondes dans le groupe traité, en particulier chez les patients subissant une oophorectomie. L'incidence d'une thrombose des veines profondes dans les deux groupes selon le type d'opération est montrée dans le Tableau 8.

TABLEAU 7

30 Incidence d'une thrombose des veines profondes dans les deux groupes de patients.

7

Groupes		Nombre de cas		Nombre de patients avec une thrombose des veines profondes	Nombre de patients avec une thrombose bilatérale
5					
	Gynécologie : témoin	32	12 (37,5 %)	8	
	traitement	32	5 (15,6 %)	3	
	Chirurgie : témoin	38	13 (34,2 %)	7	
	générale : traitement	38	6 (15,8 %)	3	
10	Nombre total de patients	140	36 (25,7 %)	21	

TABLEAU 8

Incidence d'une thrombose des veines profondes
dans les deux groupes de patients, en fonction
de l'opération pratiquée

Opération	Groupe placebo		Groupe traité	
	Nombre de patients (%)	Nombre de patients avec une thrombose des veines profondes (%)	Nombre de patients (%)	Nombre de patients avec une thrombose des veines profondes (%)
20				
<u>Gynécologie</u>				
Hystérectomie abdominale	15(50%)	5(15,6%)	16(50%)	2(6,3%)
25 Hystérectomie abdominale et oophorectomie	9(28,1%)	4(12,5%)	10(31,2%)	2(6,3%)
Oophorectomie bilatérale	5(15,6%)	2(6,3%)	4(12,5%)	1(3,1%)
30 Résection de la base pelvienne	2(6,3%)	1(3,1%)	2(6,3%)	0(0)

Chirurgie générale

Laparotomie	16(42,1%)	8(21,1%)	14(36,8%)	2(5,3%)
Mastectomie	9(23,7%)	4(10,5%)	10(26,3%)	2(5,3%)
Surrénalectomie	10(26,3%)	1(2,6%)	9(23,7%)	1(2,6%)
5 Divers	<u>3(7,9%)</u>	<u>0(0)</u>	<u>5(13,2%)</u>	<u>1(2,6%)</u>

Une perte de sang excessive pendant ou après l'opération n'était un problème chez aucun des patients dans le groupe traité ou le groupe témoin.

Le temps d'agrégation des plaquettes était nettement 10 augmenté chez les patients traités au CSA "actif" . On n'a observé aucune différence dans la numération des plaquettes dans les deux groupes, ni aucun changement significatif dans l'hématocrite.

L'introduction de l'essai au fibrogène radioactif a
15 montré l'importance du problème posé par les thromboses post-
opératoires des veines profondes et la corrélation avec la
phlébographie a confirmé que ce test constituait une méthode
précise et rapide pour évaluer l'incidence et le site des
thrombus chez les patients venant d'être opérés.

20 Chez les patients ayant subi une opération chirurgicale générale, les thrombus débutent normalement dans les sinus profonds du mollet et si la thrombose est limitée à ces veines et aux veines tibiales profondes, le risque d'embolie pulmonaire est faible. Cependant, une extension du thrombus dans
25 les veines poplitées et fémorales inférieures augmente le risque d'une embolie pulmonaire. Il est donc particulièrement important de prévenir si possible une thrombose post-opératoire des veines profondes et limiter la propagation si un thrombus du mollet se développe.

30 Ces résultats indiquent que le CSA "actif" diminue
l'incidence d'une thrombose post-opératoire des veines pro-
fondes, tel que mis en évidence par le test au fibrinogène
radioactif chez les patients ayant subi des interventions chi-
rurgicales d'ordre général et chez les patients ayant subi des
35 interventions gynécologiques. On ne constate aucune complica-

tion provenant de l'administration du médicament. La vérification de la fonction des plaquettes et des effets des différents médicaments in vitro peut ne pas refléter la situation in vivo. Néanmoins, ces tests sont utilisés à titre d'indicateurs et confirment que les patients ont reçu un traitement actif. Il est impossible de définir ici, d'après les résultats obtenus, les modes d'action possibles du CSA "actif" bien que l'inhibition de l'agrégation des plaquettes et la prolongation du temps de coagulation du plasma par la thrombine soient invoqués. Cependant, il faut noter que le CSA "actif" s'est avéré réduire également les taux élevés de fibrinogène dans le plasma et cette observation peut être importante quant à l'effet bénéfique du CSA "actif".

REVEN DICATIONS

- 1 - Procédé de préparation du sulfate de chondroïtine A actif ou du sulfate de chondroïtine C actif ou d'un mélange de ces deux sulfates, caractérisé en ce qu'on forme une solution aqueuse de(s) sulfate(s) de chondroïtine à partir d'un matériau provenant d'une source appropriée, on ajoute à la solution un agent complexant pour former un précipité qui est un complexe insoluble dans l'eau de(s) sulfate(s) de chondroïtine et de l'agent complexant, et on recueille le(s) sulfate(s) de chondroïtine à partir du complexe.
- 2 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le matériau de la source est un tissu de mammifère.
- 3 - Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la source est un cartilage de trachée de bovin.
- 4 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le matériau de la source est un tissu de poisson.
- 5 - Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le matériau de la source est dégraissé avant de former la solution.
- 6 - Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le matériau de la source est broyé avant de former la solution.
- 7 - Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le matériau de la source est digéré avec une enzyme pour éliminer les protéines.
- 8 - Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'agent complexant est un sel d'ammonium quaternaire ou une résine échangeuse d'anions.
- 9 - Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le complexe est scindé par une base ou une solution saline hypertonique pour en extraire le(s) sulfate(s) de chondroïtine.
- 10 - Complexe insoluble dans l'eau, de sulfate de chondroïtine A et/ou de sulfate de chondroïtine C et d'un agent

complexant.

- 11 - Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend comme ingrédient actif le sulfate de chondroïtine A et/ou le sulfate de chondroïtine C préparé(s) par
- 5 un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 ou à partir d'un complexe insoluble dans l'eau selon la revendication 10, avec un véhicule ou un diluant physiologiquement acceptable.

Bruxelles, le 3 octobre 1980

P.Pon.de BIOMED RESEARCH, INC.

OFFICE KIRKPATRICK - G.C. PLUCKER.

