



MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

NUMERO DE PUBLICATION : 1006133A6

NUMERO DE DEPOT : 09200749

Classif. Internat. : C08B A61K

Date de délivrance le : 24 Mai 1994

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d'invention, notamment l'article 22;

Vu l'arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, notamment l'article 28;

Vu le procès verbal dressé le 24 Aout 1992 à 14H30 à l'Office de la Propriété Industrielle

ARRETE :

ARTICLE 1.- Il est délivré à : SYNTEX S.A.
R. Saenz Pena Ave. 852, 6th Fl. "A", AR-1035 BUENOS AIRES(ARGENTINE)

représenté(e)s par : CLAEYS Pierre, GEVERS Patents, Rue de Livourne 7 Bte 5 - B
1050 BRUXELLES.

un brevet d'invention d'une durée de 6 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : DERIVES D'HEPARINE, LEUR PREPARATION ET LEUR UTILISATION.

INVENTEUR(S) : Diaz Victor Bautista, R. Saenz Pena Ave. 852, 6th Fl. "A", AR-1035
Buenos Aires (AR); Domanico Ricardo Hugo, R. Saenz Pena Ave. 852, 6th Fl. "A", AR-1035
Buenos Aires (AR); Fussi Fernando, Via Bagutti 22, CH-6900 Lugano (CH)

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeur(s).

Bruxelles, le 24 Mai 1994
PAR DELEGATION SPECIALE :

R. DE COCKEPE
Secrétaire d'Administration

**"Dérivés d'héparine, leur préparation
et leur utilisation"**

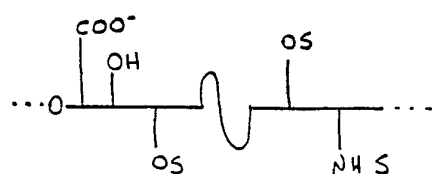
L'héparine, HP, un hétéropolysaccharide complexe obtenu par extraction de tissus animaux spécifiques (muqueuse intestinale et poumon), contient des unités structurales de restes d'hexuronyle (L-iduronyle- et D-glucuronyle-), en majeure partie sous la forme d'iduronyl-2,0-sulfate, et de restes de glucosamine, en majorité sous la forme de N,6-O-disulfate de glucosamine.

Les héparanesulfates, (HS), présents partout en très petites quantités dans les tissus animaux, diffèrent structurellement de l'héparine par deux caractéristiques principales : la teneur en iduronyl-2-O-sulfate est faible (les restes d'hexuronyle sont présents pour la plupart sous forme non sulfatée) et les restes de 6-O-sulfate de N-acétyl-glucosamine sont prédominants.

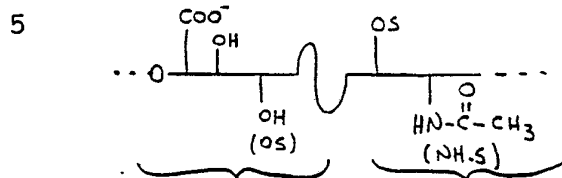
La biosynthèse de HP et HS se fait par deux schémas séparés et les propriétés biologiques, ainsi que les implications thérapeutiques, sont différentes.

Les deux structures peuvent être résumées par les schémas abrégés suivants :

- 2 -



Héparine



Héparanesulfate

10 fragment d'hexuronyle fragment de glucosamine

dans lesquels : CO₂⁻ représente le groupe carboxy en position 6 de l'uronate

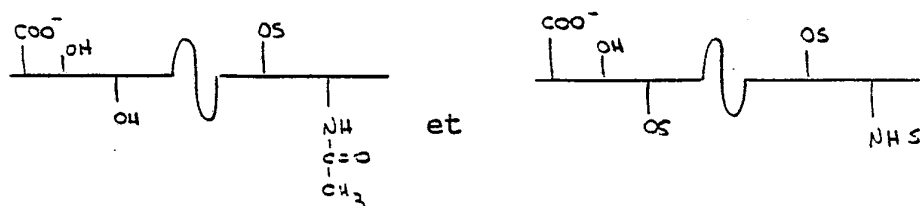
S représentent les groupes SO₃⁻

Ac représente le groupe acétyle.

15 On a obtenu, par un procédé de synthèse original en partant d'héparine, des molécules ayant les principales caractéristiques présentent dans les héparanesulfates et des propriétés biopharmacologiques similaires aux héparanesulfates naturels. Par ce procédé, on

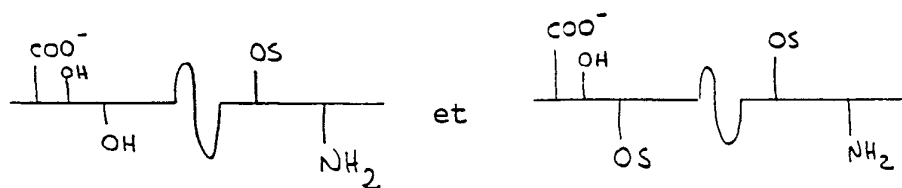
20 peut également moduler les quantités de sulfate d'iduro-nyle résiduel et de N-sulfate de glucosamine résiduel afin de coupler les propriétés de l'héparine et des héparanesulfates, en tombant entre les structures limites :

25



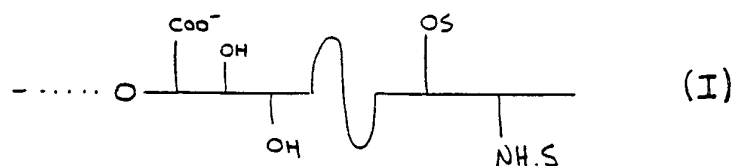
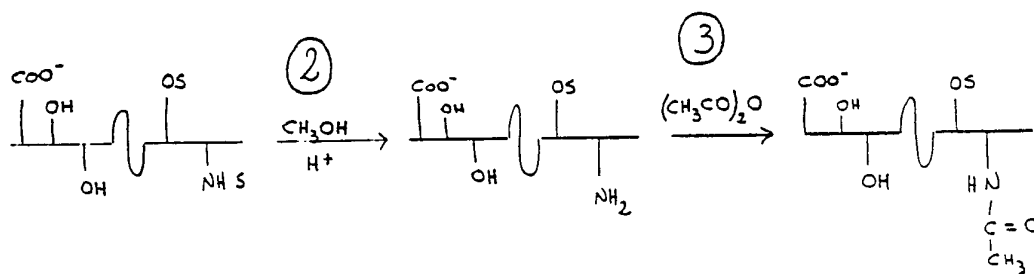
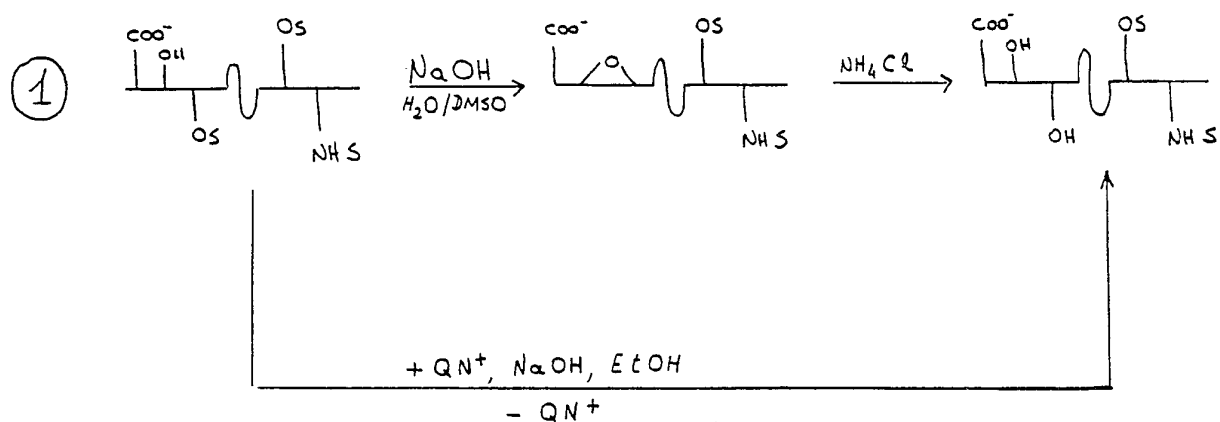
30

35 Comme produits intermédiaires, on peut également isoler des structures ayant différentes quantités préalablement fixées d'azote d'amino libre dans les restes de glucosamine, comme indiqué par les structures limites :



5

Le procédé prévoit trois phases principales,
telles que résumées ci-après :



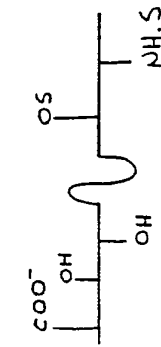
La phase 1 consiste en la dé-O-sulfatation du fragment de sulfate d'iduronyle dans les structures d'héparine. Elle peut être réalisée en une ou deux étapes. Les deux voies ont été initialement développées dans les laboratoires de la société déposante et constituent la principale nouveauté du procédé revendiqué.

En fait, la dé-O-sulfatation dans des alcalis a été décrite [Perlin, Carbohydrate Research, 200 (1990), 437-447, Advances in Carbohydrate Chemistry 20, 1965, 201-203]. Mais, compte tenu de l'expérience de la déposante, tous les procédés opérant en solution aqueuse mènent à une désulfatation partielle également en la position 6-O du fragment de glucosamine, un point important à préserver pour l'activité biologique totale des composés. Seul le traitement de l'invention dans un mélange d'H₂O/DMSO 1/1 permet une désulfatation spécifique en la position 2-O du L-iduronate, sans toucher aux autres points sulfatés de la molécule, comme indiqué par les spectres RMN. De plus, le procédé permet l'isolement d'une forme anhydro intermédiaire stable, spécifique pour obtenir des transformations des groupes hydroxy libres en positions C₂ et C₃ dans l'ouverture ultérieure du pont.

Aucun procédé de dé-O-sulfatation n'a été décrit jusqu'à présent, dans la mesure des connaissances de la déposante, en travaillant sur des complexes d'héparine. Il a été démontré que la synthèse de l'invention réalisée en phase homogène et en une seule étape, sans la formation de formes anhydro intermédiaires, mène au même produit que ceux obtenus par le traitement à l'H₂O/DMSO et par un traitement ultérieur avec des solutions de chlorure d'ammonium ou d'acétate (réaction en deux étapes).

Les produits obtenus par la phase 1 (en une ou deux étapes) ont la même forme généralisée (comme montré par les spectres ¹³C-RMN à 50 MHz) :

5

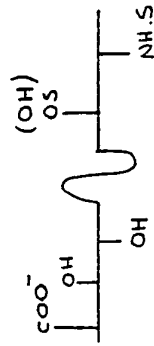


10

Composé I, obtenu par traitement dans du DMSO/H₂O/NaOH (avec conservation du 6-O-sulfate dans le fragment de glucosamine)

Id 2 OSO₃ 66 % (initial : 90 %)
 Gluc. NSO₃ 91 % (initial : 91 %)
 Gluc. 6OSO₃ 89 % (initial : 89 %)

15



Composé I, obtenu par traitement dans du QN-NaOH-EtOH (avec perte partielle de 6-O-sulfate dans le fragment de glucosamine)

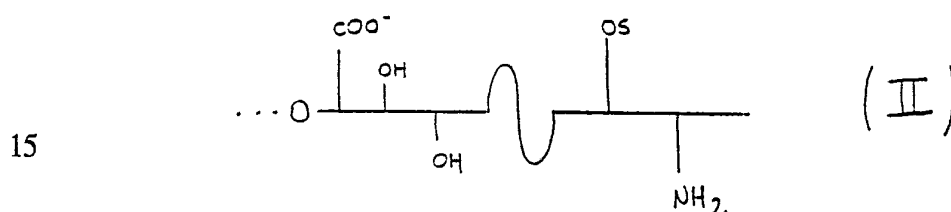
Id 2 OSO₃ 70 % (initial : 90 %)
 Gluc. NSO₃ 91 % (initial : 91 %)
 Gluc. 6OSO₃ 75 % (initial : 89 %)

- 5 -

- 6 -

Les composés I possèdent tous les groupes N-sulfate présents dans l'héparine et une activité anti-coagulante importante in vitro (60-100 UI/mg contre 150 UI/mg pour l'héparine). Les Exemples 1 et 2 décrivent plus particulièrement le procédé de l'invention de dé-O-sulfatation de l'héparine en une et en deux étapes avec isolement de la forme anhydro intermédiaire.

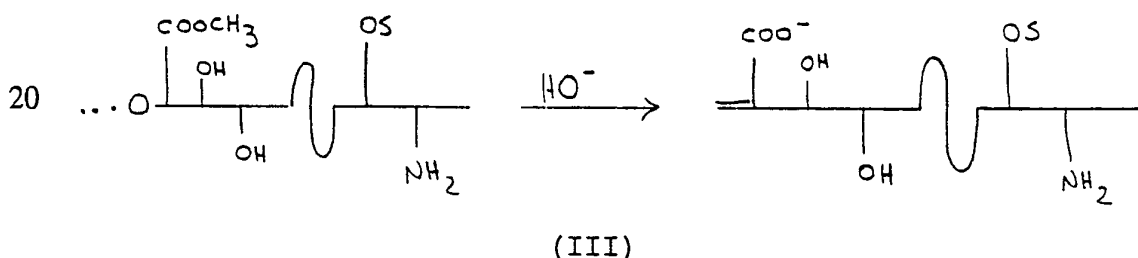
Afin d'obtenir des structures similaires aux héparanesulfates naturels, on doit réaliser une dé-N-sulfatation partielle ou totale, suivie d'une N-acétylation des composés intermédiaires :



La dé-N-sulfatation et la N-acétylation sont réalisées en deux ou trois phases : on chauffe au reflux dans du méthanol/acide sulfurique (1 % en volume/volume de H₂SO₄ concentré dans du CH₃OH) pendant une heure, on ajoute 0,5 volume d'une solution de Na₂CO₃ à 2 % (pH final = 9,0-9,5), on porte à ébullition pendant une heure et on récupère le composé II ou on dilue avec 2 volumes de solution de Na₂CO₃ à pH = 9,0-9,5 afin de dissoudre le composé II, et on traite par de l'anhydride acétique en une quantité correspondant à 0,5-0,2 % en poids/poids du composé II initial. Dans ces conditions, un pH de 9,5 représente la limite supérieure de stabilité pour l'anhydride acétique en solution. La réaction dans le méthanol/acide sulfurique, dans lesquels les composés I et le composé II intermédiaire sont insolubles, permet de travailler en phase hétérogène et, par conséquent, dans des conditions douces malgré la présence d'un acide fort et d'une température élevée. Dans ces cas, la réaction parasitaire conduisant à la

méthylation du groupe carboxy en position 6 du reste d'uronate est minimisée (en tout cas, le traitement par du carbonate chaud est capable de reconvertir toute estérification).

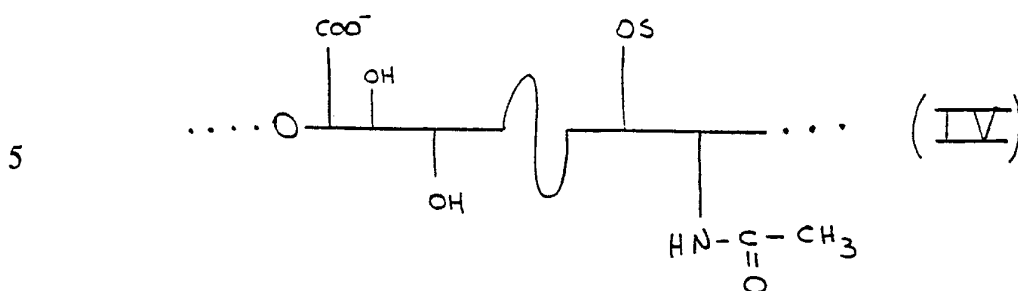
5 On a remarqué qu'en travaillant sous des conditions plus fortes, par exemple sous autoclave dans du $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}^+$, le taux d'estérification se poursuit. On a également remarqué qu'un traitement des esters méthyliques, formés de cette manière, par des solutions
10 alcalines fortes conduit à une saponification et, en même temps, à une rupture de la liaison glycosidique adjacente à la position 4 dans le fragment d'uronyle. Par conséquent, il se produit une dépolymérisation du polymère avec l'apparition de restes d'uronate α - β
15 insaturés terminaux (élimination β), les groupes carboxy ayant été estérifiés le long du polymère, suivant la réaction :



25 En contrôlant le processus d'estérification, on peut obtenir des composés III ayant un poids moléculaire moyen présélectionné, différent et on peut les transformer aisément en dérivés N-sulfatés ou N-acétylés.

30 Le processus décrit ci-dessus en deux et trois phases du procédé de la présente invention permet d'obtenir des composés IV similaires aux héparanesulfates naturels, ayant la structure (représentée ici sous une forme limite, abrégée) :

35



10 Les spectres ^{13}C -RMN des composés, tels que décrits dans les Exemples, sont annexés. Les caractéristiques principales sont mises en évidence :

Pic à 99,9 ppm : sulfate d'iduronyle (présent dans HP, faible ou nul dans I, II, IV, HS)

15 Pic à 55,0 ppm : groupe N-acétyle (absent dans HP, I, II; présent dans IV et HS)

Pic à 55/92 ppm : groupe NH_2 libre (présent seulement dans II)

Pic à 51/52 ppm : forme anhydro ($\text{C}_2\text{-C}_3$)

20 Les composés IV ont des propriétés très similaires aux HS. En particulier, ils sont dépourvus d'activité anti-coagulante in vitro mais ils présentent des activités antithrombotique et fibrinolytique élevées dans des modèles expérimentaux (thrombus induit à la K-carragénine dans des queues de rat), comme on peut le voir par les résultats donnés ci-après (on considère la longueur de queue atteinte d'un infarctus par rapport à la longueur de queue totale pour calculer le degré de thrombose) :

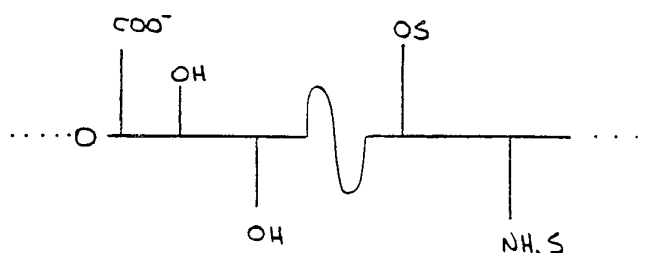
25

<u>Héparine de la qualité parentérale</u>		<u>Composé IV</u>	
Dosage	Thrombus restant	Dosage	Thrombus restant
0,5 mg/kg	85 %	2,5 mg/kg	42 %
1,0 mg/kg	70 %	5,0 mg/kg	23 %
2,5 mg/kg	50 %	10,0 mg/kg	0 %

Les Exemples 1, 2, 3 et 4 décrivent les phases 1, 2 et 3 avec la caractérisation des produits obtenus dans chaque cas.

Exemple 1

On décrit l'obtention de composé I,



procédé dont la totalité est atteinte en deux phases, permettant :

- a) La désulfatation 2-O sélective du fragment iduronique de polysaccharide, avec la conservation de la teneur en 6-O-SO₃ dans l'unité glucosaminique.
- b) L'ouverture de l'époxyde intermédiaire.

Les conditions expérimentales sont décrites de la façon suivante :

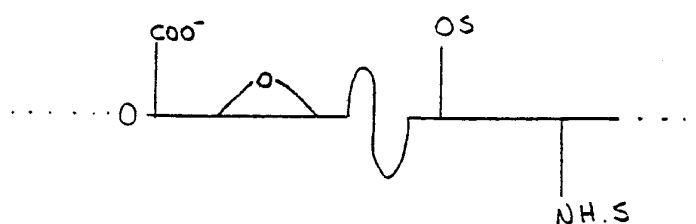
- a) on dissout 10 g d'héparine de sodium injectable, de la qualité USP (150 UI/mg) dans 100 ml d'une solution 0,5 M de NaOH dans l'H₂O/DMSO (1/1 en volume/volume).

- 10 -

On chauffe sous reflux pendant 60 minutes à 80°C. Le produit de réaction résultant est isolé par l'addition de 2 g de NaCl et de 200 ml d'éthanol absolu, en ajustant préalablement le pH à 6,0 avec du HCl 1M.

5 La matière, sous la forme d'une pâte hydroalcoolique, est déshydratée avec de l'alcool absolu et est séchée dans une étuve sous vide pendant 24 heures à 60°C. La production obtenue est de 7 g et correspond à la formule générale mentionnée ci-dessus.

10



15

Le tableau suivant montre les caractéristiques analytiques de la matière obtenue :

20

Puissance USP	4 UI/mg	(initial : 150 UI/mg)
Soufre total	9,0 %	(initial : 12,3 %)
Idu 2-O-S (RMN- ¹³ C)	66,0 %	(initial : 90 %)
Gluc. NS (RMN- ¹³ C)	91,0 %	(initial : 91 %)
Gluc. 6-O-S (RMN- ¹³ C)	89,0 %	(initial : 89 %)
Pic à 51-52 ppm (forme anhydro)	présent	---

25

Voir Fig. 1

30

b) On dissout 10 g du produit obtenu dans a) dans 100 ml d'une solution aqueuse à 10 % en poids/volume de NH₄Cl.

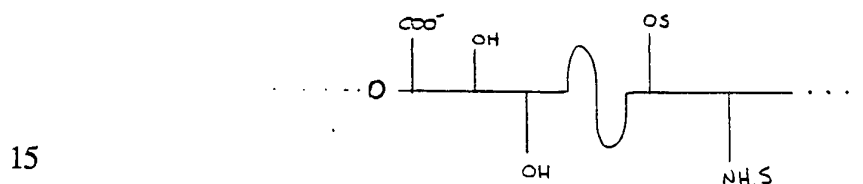
On chauffe le mélange de réaction dans un récipient scellé pendant 7 heures à 100°C. Une fois le

temps de réaction fini, on dialyse le mélange de réaction avec une membrane de cellophane contre 2-5 litres de NaCl aqueux 0,1 M.

On précipite la solution résultante par l'addition de 2 volumes d'éthanol.

La pâte résultante est rendue anhydre avec de l'éthanol et séchée sous vide pendant 24 heures à 60°C.

La production obtenue est de 8 g de produit final, de la formule générale :



avec les caractéristiques suivantes.

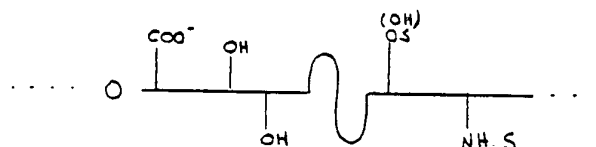
Puissance USP	:	24 UI/mg
20 Soufre total	:	8,9 %
Id 2-O-S	:	65,0 %
Gluc. N-S	:	91,0 %
Gluc. 6-O-S	:	89,0 %
Pics à 51-52 ppm	:	absent
25 (forme anhydro)		

Voir Fig. 2

Exemple 2

On décrit l'obtention de composé I :

30



35 procédé dont la totalité est atteinte en une seule étape (sans la formation de sucre anhydre intermédiaire).

- 12 -

Les conditions expérimentales sont les suivantes :

On dissout totalement 10 g du complexe (non soluble dans l'eau) constitué par de l'héparine USP et du bromure de cétyle triméthyle ammonium dans 100 ml d'éthanol à 96 % en volume/volume, qui contient du NaOH dissous en quantité suffisante pour atteindre une concentration de 0,1 M.

On chauffe le mélange de réaction dans un récipient scellé pendant 30 minutes à 110°C.

Une fois la réaction terminée, on ajoute 200 ml d'une solution de NaCl 2 M (développement complexe) et on fait précipiter le polysaccharide en ajoutant 600 ml d'éthanol anhydre et on le sèche sous vide pendant 24 heures à 60°C. La production est de 3 g de produit sec.

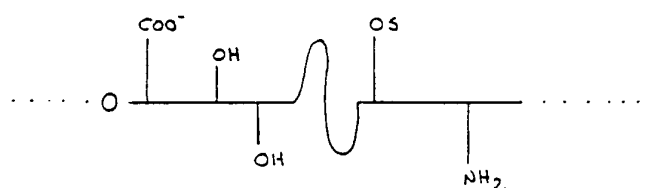
Les caractéristiques analytiques sont les suivantes :

Puissance USP	60 UI/mg	(initial : 150 UI/mg)
Soufre total	10,0 %	(initial : 12,3 %)
Id 2OSO ₃	70,0 %	(initial : 90,0 %)
Gluc. NSO ₃	91,0 %	(initial : 91,0 %)
Gluc. 6OSO ₃	75,0 %	(initial : 89,0 %)
Pic à 51-52 ppm (forme anhydro)	absent	

Voir Fig. 3

Exemple 3

On décrit l'obtention du composé II de la façon suivante :



5

composé obtenu par la phase 2.

On met en suspension 10 g du produit obtenu dans les Exemples (1b) ou (2) dans 100 ml de méthanol absolu qui contient 1 ml de H₂SO₄ concentré. On chauffe le mélange de réaction au reflux et sous agitation à 64°C pendant 60 minutes.

Une fois la réaction terminée, on le filtre pour retenir la matière insoluble, que l'on dissout dans 200 ml d'eau désionisée.

On ajuste le pH à 6,0 avec du NaOH 1 M et on isole le produit par l'addition de 400 ml d'éthanol. La matière résultante est rendue anhydre avec de l'éthanol et séchée sous vide pendant 24 heures à 60°C.

La production est de 7 g.

Les caractéristiques analytiques sont les suivantes :

Puissance USP : < 2 UI/mg

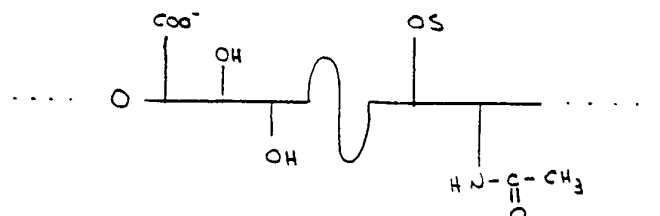
Soufre total : 8,3 %

Glucosamine N-désulfatée : 48 moles/100 moles

25

Exemple 4

On décrit l'obtention du composé IV de la façon suivante :



30

composé obtenu par la phase 3.

On dissout 10 g du produit obtenu dans l'Exemple (3) dans 100 ml d'eau distillée.

35

- 14 -

On ajuste le pH à 9,0-9,5 avec une solution aqueuse à 20 % en poids/volume de Na_2CO_3 , tout en procédant à l'addition de 2 g d'anhydride acétique et en maintenant le pH à 9,0-9,5 avec l'addition goutte à goutte de solution de Na_2CO_3 .

Après 30 minutes, on ajoute 2 g de NaCl et 200 ml d'éthanol absolu.

La pâte résultante est rendue anhydre avec de l'éthanol et séchée sous vide pendant 24 heures à 60°C.

La production est de 8 g.

Les caractéristiques analytiques sont les suivantes :

Puissance USP	< 2 UI/mg
15 Soufre total	7,0 %
Id 2 OSO_3	50,0 %
Glucosamine NSO_3	45,0 %
Glucosamine 6 OSO_3	75,0 %

Voir Fig. 4

Les exemples mentionnés ne sont pas limitatifs, la progression du développement de chaque réaction permettant évidemment d'obtenir des molécules de polymères avec une composition oscillant entre les structures représentées.

25

REVENDICATIONS

1. Analogue d'héparine ne présentant pas de groupes sulfate en position 2-O des restes de L-iduronyle.

5 2. Dérivé d'héparine ayant une structure similaire à un héparanesulfate naturel en restes de sulfate de L-iduronyle et de N-acétyl-glucosamine.

3. Procédé permettant de séparer de manière spécifique les groupes 2-O-sulfate des restes de sulfate
10 de L-iduronyle de l'héparine :

a) avec la formation d'une forme anhydro intermédiaire : par la réaction d'héparine dans une solution alcaline forte (0,5 M dans du NaOH) d'eau/diméthylsulfoxyde 1/1 en volume/volume à 80-100°C pendant
15 40-80 minutes, suivie d'une ouverture du pont O résultant de la forme anhydro par une mise en autoclave à 100-120°C pendant 6-9 heures dans une solution aqueuse à 10 % en poids/volume de chlorures ou d'acétates de cations monovalents, d'une manière plus spécifique du chlorure d'ammonium, de l'acétate
20 d'ammonium, les produits étant récupérés par précipitation dans de l'éthanol;

b) sans la formation d'un produit intermédiaire : par la réaction d'un complexe d'héparine insoluble dans
25 l'eau avec des sels d'ammonium quaternaire, d'une manière plus spécifique du bromure de cétyl triméthyl ammonium, avec du NaOH dissous à 0,4 % en poids/volume dans de l'éthanol à 96 % en volume/volume (dans lequel le complexe d'héparine est
30 soluble), en autoclave à 100-120°C pendant 15-30 minutes, les produits étant récupérés par coupure du complexe en solution saline (NaCl 2 M) suivie d'une précipitation dans de l'éthanol.

4. Procédé permettant de produire un dérivé
35 d'héparine similaire à un héparanesulfate naturel à partir d'héparine, par la séparation des groupes 2-O-

sulfate suivant la revendication 3, suivie d'une N-désulfatation des restes glucosamino par chauffage au reflux dans du méthanol contenant de l'acide sulfurique à 1 % en volume/volume dans lequel l'héparine désulfatée
5 est insoluble, pendant 80-100 minutes, d'une filtration, d'une dissolution dans l'eau, d'un ajustement du pH à 9,0-9,5 avec du carbonate de sodium et d'une réaction avec de l'anhydride acétique en quantités correspondant à 0,1-0,2 poids/poids de la O,N-désulfohéparine de
10 départ, le produit étant récupéré par précipitation dans de l'éthanol.

5. Analogues et dérivés d'héparine suivant l'une ou l'autre des revendications 1 et 2, doués d'une activité antithrombotique et profibrinolytique.

15 6. Compositions pharmaceutiques contenant un analogue ou un dérivé d'héparine suivant l'une ou l'autre des revendications 1 et 2 comme principe actif, destinées à une utilisation par voie injectable, orale et topique, dans le cadre de maladies thrombotiques
20 aiguës et chroniques, dans lesquelles une activation de la fibrinolyse est nécessaire.

- 17 -

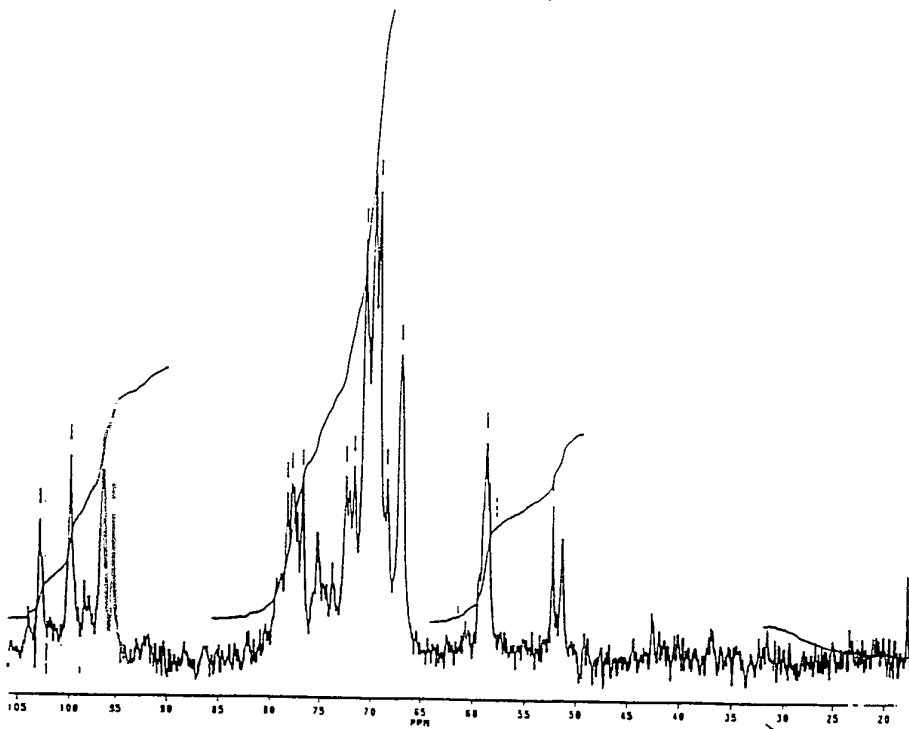


FIG. 1

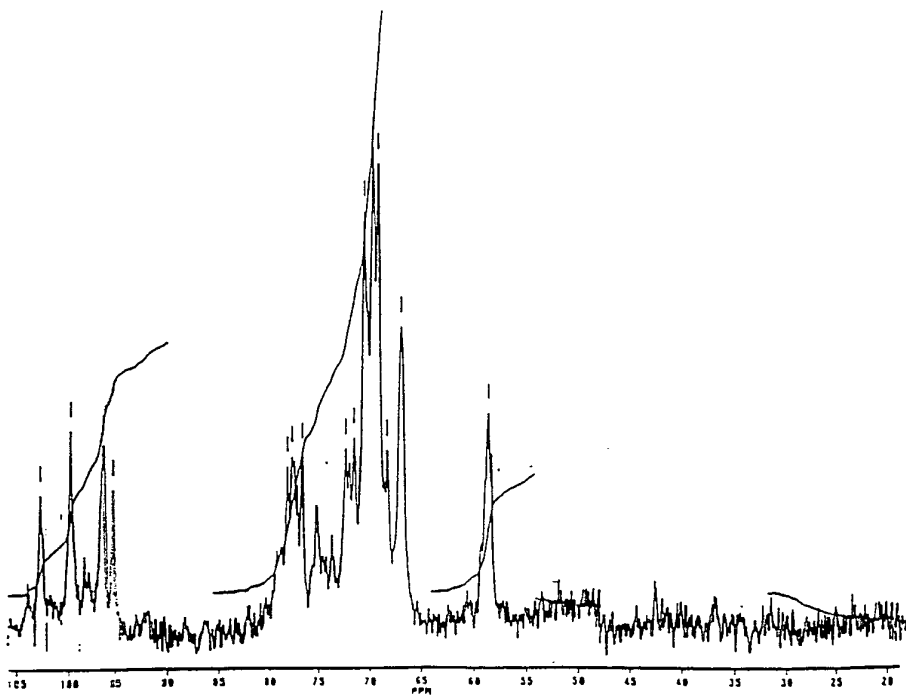


FIG. 2

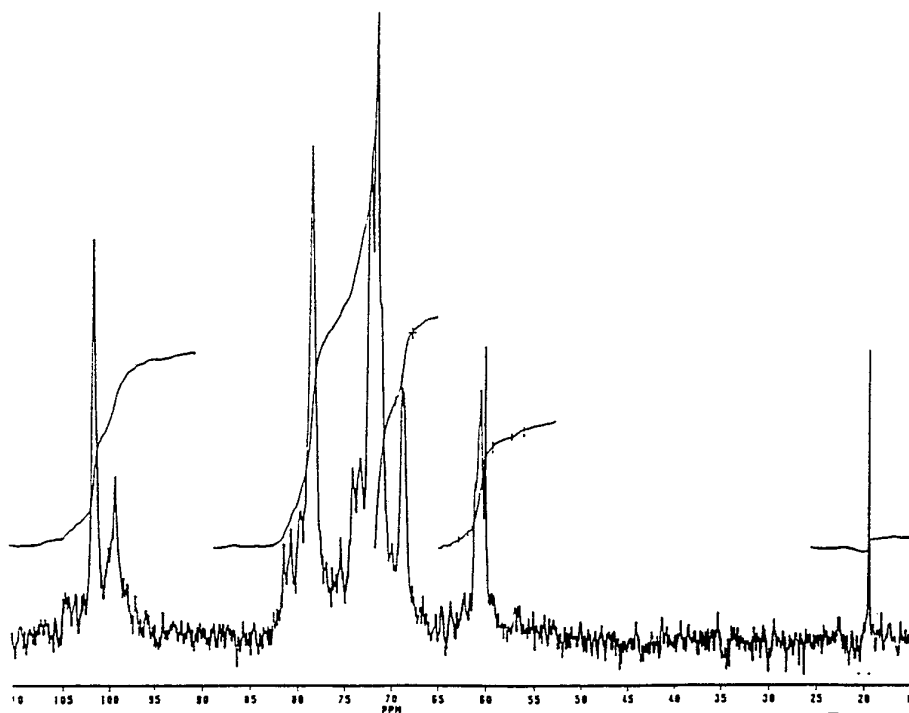


FIG. 3

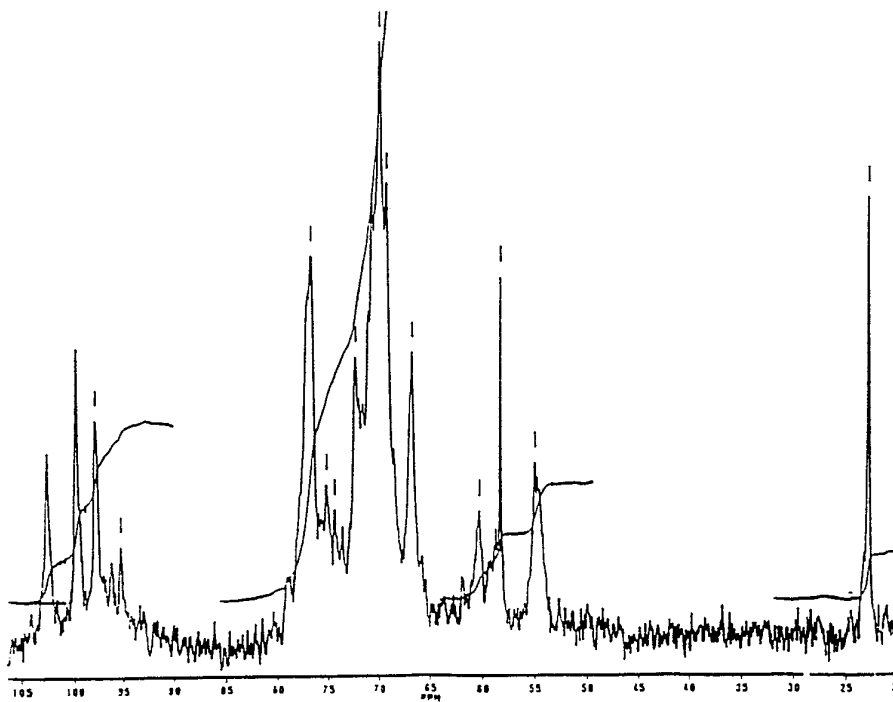


FIG. 4