

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 914 191

②① N° d'enregistrement national : **07 02314**

⑤① Int Cl⁸ : **A 61 K 47/36** (2006.01), A 61 K 38/18, 47/42, A 61 P 9/10

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 29.03.07.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la demande : 03.10.08 Bulletin 08/40.

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

⑥① Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *PROTEINS & PEPTIDES MANAGEMENT — FR.*

⑦② Inventeur(s) : SOULA OLIVIER, SOULA GERARD, SOULA REMI et ELOY ROSY.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET LAVOIX LYON.

⑤④ COMPOSITION ANGIOGENIQUE.

⑤⑦ La présente invention concerne l'utilisation d'un polymère amphiphile pour la préparation d'une composition thérapeutique destinée à favoriser l'angiogénèse sur son site d'administration, ladite composition comprenant un complexe entre le polymère amphiphile et un PDGF.

Dans un mode de réalisation, le PDGF est choisi dans les PDGFs recombinants humains comportant deux chaînes B.

Elle concerne également l'utilisation selon l'invention caractérisée en ce qu'elle permet une administration de 10 µg à 10 mg par ml de PDGF.

FR 2 914 191 - A1



La présente invention concerne un nouveau traitement angiogénique à base de PDGF, platelet derived growth factor.

Cette invention est utile pour le traitement des problèmes d'ischémie. On pense notamment à l'ischémie périphérique comme l'ischémie d'un membre inférieur, aux escarres, aux ulcères veineux, aux ulcères de compression, à l'ischémie myocardique, à la colite, au syndrome de Raynaud, à l'ostéonécrose de la tête fémorale, à certains problèmes ophtalmiques d'origine vasculaire, à l'ischémie de la papille de l'œil, aux ulcérations de la cornée et à certaines complications survenant lors du diabète en particulier des ulcérations neuropathiques du pied diabétique.

L'angiogénèse représente un défi thérapeutique majeur. D'une part, il y a un enjeu parfois vital de revasculariser des organes, des tissus et d'autre part, il n'existe aucun moyen pharmacologique de créer de nouveaux vaisseaux. Les seuls agents thérapeutiques disponibles sont les agents vasodilatateurs qui augmentent temporairement le diamètre et / ou le débit de vaisseaux existants. Créer *de novo* un vaisseau n'est pas possible, et lorsque le flux sanguin est réduit du fait de lésions de la paroi vasculaire (athérome, athérosclérose), la chirurgie vasculaire permet d'assurer par dérivation ou pontage un flux sous la lésion, en utilisant des prothèses ou des greffes vasculaires (respectivement en matériaux de synthèse ou biologiques). Seuls des vaisseaux de diamètre égal ou supérieur à 4 mm sont accessibles à ces remplacements malgré l'utilisation de techniques microchirurgicales. La revascularisation périphérique des tissus, qui dépendent de capillaires de quelques centaines de microns de diamètre, ne peut donc pas être envisagée par ces techniques chirurgicales et seule la stimulation d'une croissance de néovaisseaux ou angiogénèse peut être envisagée.

L'angiogénèse est aujourd'hui bien décrite sur le plan scientifique et les facteurs de croissance impliqués sont bien connus avec entre autres par ordre d'importance, le VEGF, le $TNF\alpha$, le $TGF\alpha$, la thrombine, la proliférine, le PDGF, la MMP-1, la MMP-2, la MMP-9, l'IL-1, l'IL-4, l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-13. De nombreux groupes scientifiques académiques et industriels travaillent à une utilisation thérapeutique de ces protéines. Pour deux de ces facteurs de croissance, leur intérêt a été démontré en clinique.

Le plus efficace de ces facteurs de croissance angiogéniques est le VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor VEGF (Pandya, N. M. *et al.*, *Vascul.Pharmacol.* **2006**, 44 (5), 265-274.). Ce facteur de croissance a été récemment testé sur un modèle de plaie de souris diabétique par Genentech (Galiano, Robert D. *et al.*, *Am.J.Pathol.* **2004**, 164 (6), 1935-1947.). Ce facteur de croissance démontre une efficacité bien supérieure au contrôle dans ce modèle à la fois en terme de formation du tissu de granulation, de néovascularisation et de temps de cicatrisation. Les résultats confirment l'importance de la néovascularisation dans le processus de cicatrisation. Le VEGF est développé par Genentech pour le traitement des ulcères de pied diabétique. Les résultats de phase clinique I/II ont montré un taux de cicatrisation de 41% au bout de 6 semaines contre 26% pour les traitements conventionnels sans facteur de croissance. Cependant le VEGF n'est pas approuvé à ce jour et des risques de vascularisation non contrôlée sont possibles. De plus, il a été démontré que le VEGF est un initiateur de l'angiogénèse mais n'est pas suffisant pour la formation d'un réseau vasculaire mature (Yancopoulos, G. D. *et al.*, *Nature* **2000**, 407 (6801), 242-248.). L'angiogénèse avec le VEGF est donc transitoire.

20

Le PDGF est le seul facteur de croissance ayant un pouvoir angiogénique qui soit approuvé, il est produit par recombinaison génétique et est commercialisé par Johnson&Johnson sous le nom de Regranex pour le traitement de l'ulcère de pied diabétique.

25

Dans le dossier déposé par Johnson&Johnson pour l'approbation de Regranex, (Tiwari, Jawahar, *PLA 96-1408 REGRANEX (becaplermin) Gel (recombinant human platelet-derived growth factor) in the treatment of diabetic foot ulcers.* **5 Sept. 1997**, Food and Drug Administration), il est intéressant de noter qu'au cours des essais cliniques, aucune activité angiogénique efficace du PDGF n'a été observée.

30

Le PDGF-BB administré par thérapie génique confirme le potentiel angiogénique de ce facteur de croissance.

35

En effet l'administration du PDGF par thérapie génique donne de biens meilleurs résultats sur l'angiogénèse. Il s'agit d'une administration de gènes encodant le PDGF-B par un adénovecteur formulé dans une matrice de

collagène. Cette thérapie génique, Excellerate, est développée par Tissue Repair Company acquise récemment par Cardium Therapeutics. Cette méthode a l'avantage d'entretenir une production de PDGF sur le site de la plaie sur une durée assez longue. Une application de ce produit sur la plaie
5 d'un modèle de souris diabétique a montré que la granulation, la néovascularisation ainsi que l'épithélisation sont fortement stimulées (Keswani, Sundeep G. *et al.*, *Wound Repair Regen.* **2004**, 12, 497-504.).

D'autres chercheurs japonais, équipe de Y. Yonemitsu, ont montré
10 que la microangiopathie du membre inférieur du diabétique est une maladie causée par le dérèglement du couple PDGF-BB/Protéine C kinase et non pas due à un défaut d'expression des autres facteurs angiogéniques en particulier VEGF, HGF, FGF-2, Angiopoïétine-1 et -2 (Tanii, Mitsugu *et al.*, *Circ.Res.* **2006**, 98, 55-62.). Dans ces travaux, l'approche est à nouveau la thérapie
15 génique.

Cependant la thérapie génique a peu de chance d'être industrialisée dans un avenir proche à cause de ses risques potentiels en particulier en terme de réponse immunologique.

20

Un autre type d'administration du PDGF a été publié par Hsieh P. *et al.* Il s'agit de formulations du PDGF-BB avec un oligopeptide synthétique capable de former des nanofibres qui sont injectées dans le myocarde (Hsieh, P. C. *et al.*, *J.Clin.Invest.* **2006**, 116 (1), 237-248.)(Hsieh, Patrick C. H. *et al.*,
25 *Circulation* **2006**, 114, 637-644.). Leur technique permet une libération du PDGF sur 14 jours et ils ont obtenu une régénération du myocarde sur un modèle de rat porteur d'un infarctus. Selon les mêmes auteurs, dans cette formulation, les nanofibres semblent avoir un pouvoir angiogénique intrinsèque (Narmoneva, Daria A. *et al.*, *Biomaterials* **2005**, 26, 4837-4846.).

30

Ainsi il apparaît que le PDGF par son activité angiogénique intrinsèque et par son caractère non toxique prouvé après des années d'utilisation chez les patients est un candidat unique pour traiter les maladies liées à des ischémies.

35

Ainsi il existe un besoin d'une méthode et/ou d'un moyen d'administration locale et/ou topique du PDGF permettant de révéler une

activité angiogénique « efficace » c'est-à-dire suffisamment intense pour obtenir une densité de vaisseaux significative et susceptible de permettre la formation d'une structure néovasculaire fonctionnelle pérenne.

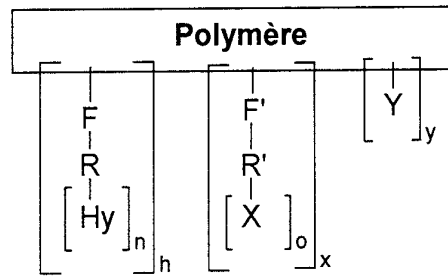
5 La présente invention permet d'obtenir une stimulation de l'angiogénèse par comparaison avec des doses équivalentes de Regranex . Cet effet angiogénique est observé au cours de la reconstruction tissulaire de plaies de rat diabétique, et s'exprime par les caractères hémorragiques du tissu néoformé, appréciés par un score semiquantitatif établi par un observateur
10 indépendant, n'ayant pas connaissance du traitement administré. Cet effet angiogénique est dose dépendant. En effet, aux mêmes doses que Regranex, on a observé des phénomènes hémorragiques intenses ayant abouti à l'interruption prématurée de l'administration du complexe du PDGF. La dose-dépendance observée signe la nature pharmacologique de l'effet observé.
15 L'effet observé est confirmé par l'analyse histologique de la densité vasculaire du tissu néoformé.

 La présente invention concerne l'utilisation d'un polymère amphiphile pour la préparation d'une composition thérapeutique destinée à
20 favoriser l'angiogénèse sur son site d'administration comprenant un complexe entre un polymère et un PDGF caractérisé en ce que le polymère est amphiphile.

 Dans un mode de réalisation, la présente invention concerne
25 l'utilisation d'un polymère amphiphile pour la préparation d'une composition thérapeutique destinée à favoriser l'angiogénèse sur son site d'administration comprenant un complexe entre un polymère amphiphile et un PDGF caractérisé en ce que le polymère amphiphile est choisi dans le groupe :

 - des polymères amphiphiles constitués d'un squelette polymérique
30 hydrophile fonctionnalisé par des substituants hydrophobes et des groupements hydrophiles de formule générale I.

5



DP = m unités monomère

formule I

dans laquelle,

- 5
 - R et R' identiques ou différents représentent une liaison ou une chaîne comprenant entre 1 et 18 carbones, linéaire, branchée et/ou insaturée comprenant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes, choisis parmi O, N ou/et S,
- 10
 - F et F' identiques ou différents représentent une fonction choisie parmi les fonctions suivantes ester, thioester, amide, carbonate, carbamate, éther, thioéther ou amine,
- 15
 - X représente un groupe hydrophile choisi dans le groupe constitué par les groupes suivants :
 - carboxylate
 - sulfate
 - sulfonate
 - phosphate
 - phosphonate
- 20
 - Y représente un groupe hydrophile choisi dans le groupe constitué par les groupes suivants :
 - sulfate
 - sulfonate
 - phosphate
 - phosphonate
- 25
 - Hy représente hydrophobe choisi dans le groupe constitué par les groupes suivants :

- alkyle linéaire ou ramifié en C8 à C30, éventuellement insaturé et/ou contenant un ou plusieurs hétéroatomes, choisis parmi O, N ou S.
- alkylaryle ou arylalkyle linéaire ou ramifié en C8 à C18, éventuellement insaturé et/ou contenant un ou plusieurs hétéroatomes, choisis parmi O, N ou S.
- polycycle en C8 à C30 éventuellement insaturé.

- n et o sont compris entre 1 et 3,
- h représente la fraction molaire de motif hydrophobe par rapport à une unité monomérique comprise entre 0.01 et 0.5
- x représente la fraction molaire de groupements hydrophiles par rapport à une unité monomérique, comprise entre 0 et 2.0.
- y représente la fraction molaire de groupements hydrophiles par rapport à une unité monomérique, comprise entre 0 et 0.5.

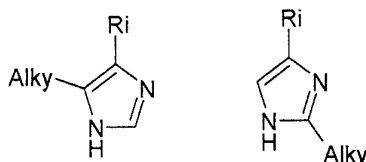
Dans un mode de réalisation, la présente invention concerne l'utilisation d'un polymère amphiphile pour la préparation d'une composition thérapeutique destinée à favoriser l'angiogénèse sur son site d'administration

comprenant un complexe entre un polymère amphiphile et un PDGF caractérisé en ce que le polymère amphiphile est un dextran bifonctionnalisé par au moins un radical imidazolyle Im et au moins un groupement hydrophobe Hy, lesdits radical et groupement étant chacun, identiques et/ou différents, et, greffés ou liés au dextran par un ou plusieurs bras de liaison R, Ri ou Rh et fonctions F, Fi ou Fh,

- R étant une liaison ou une chaîne comprenant entre 1 et 18 carbones, éventuellement branchée et/ou insaturée comprenant un ou plusieurs hétéroatomes, tels que O, N ou/et S,
- R sera dénommé Ri dans le cas des imidazoles et Rh dans le cas des hydrophobes, Ri et Rh étant identiques ou différents,
- F étant un ester, un thioester, un amide, un carbonate, un carbamate, un éther, un thioéther, une amine,

F sera dénommé Fi dans le cas des imidazoles et Fh dans le cas des hydrophobes, Fi et Fh étant identiques ou différents.

- 5
- Im étant un radical imidazole, éventuellement substitué sur l'un des carbones par un groupement alkyle (Alky) en C1 à C4, de formule



- 10
- Hy étant un groupement hydrophobe pouvant être :
 - un alkyle linéaire ou ramifié en C8 à C30, éventuellement insaturé et/ou contenant un ou plusieurs hétéroatomes, tels que O, N ou S.
 - un alkylaryle ou un arylalkyle linéaire ou ramifié en C8 à C30, éventuellement insaturé et/ou contenant éventuellement un hétéroatome
- 15
- un polycycle en C8 à C30 éventuellement insaturé.

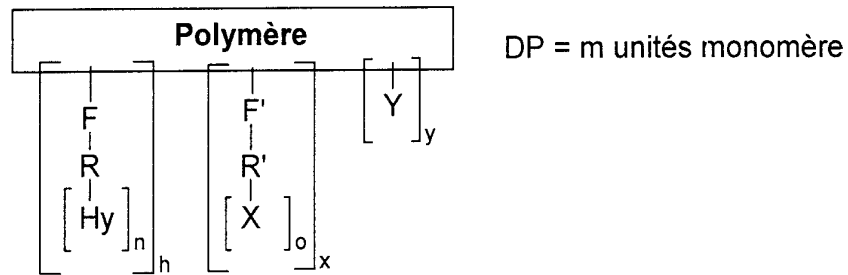
Dans un mode de réalisation, le PDGF est choisi dans le groupe des PDGFs (Platelet-Derivated Growth Factors).

- 20
- Dans un mode de réalisation, le complexe est caractérisé en ce que le PDGF est choisi dans le groupe constitué par les PDGFs recombinants humains comportant deux chaînes B (rhPDGF-BB).

- 25
- Dans un mode de réalisation, le PDGF est le PDGF-BB.

Les substituants des polymères amphiphiles constitués d'un squelette polymérique hydrophile fonctionnalisé par des substituants hydrophobes et des groupements hydrophiles de formule générale I.

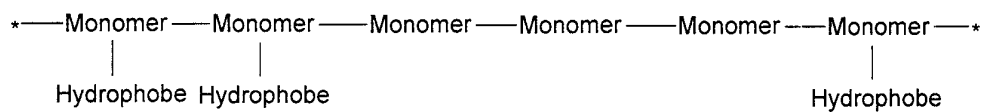
8



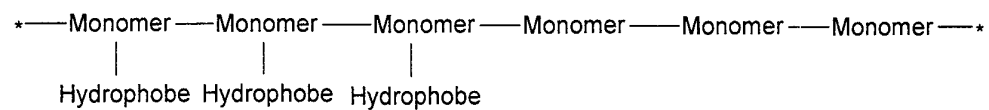
formule I

- 5 sont répartis de façon contrôlée ou statistique. Parmi les polymères ayant une répartition contrôlée des substituants, on peut citer, par exemple, les copolymères à blocs et les copolymères alternés.

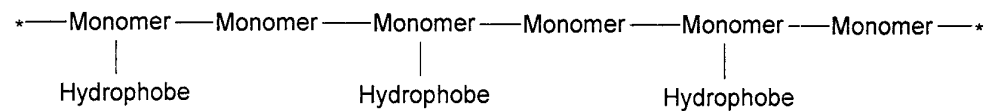
Copolymère statistique



Copolymère à blocs



Copolymère alterné



10

Ainsi dans un mode de réalisation, le polymère est choisi parmi les polymères dont les substituants sont répartis de façon statistique.

- 15 Dans un mode de réalisation, le polymère amphiphile est choisi parmi les polyaminoacides.

Dans un mode de réalisation, les polyaminoacides sont choisis dans le groupe constitué par les polyglutamates ou les polyaspartates.

Dans un mode de réalisation, les polyaminoacides sont des
5 homopolyglutamates.

Dans un mode de réalisation, les polyaminoacides sont des homopolyaspartates.

10 Dans un mode de réalisation, les polyaminoacides sont des copolymères d'aspartate et de glutamate. Ces copolymères sont soit à blocs, soit statistiques.

Dans un mode de réalisation, le polymère est choisi parmi les
15 polysaccharides.

Dans un mode de réalisation, les polysaccharides sont choisis dans le groupe constitué par les hyaluronanes, les alginates, les chitosans, les galacturonanes, la chondroïtin-sulfate, les dextrans, les celluloses.

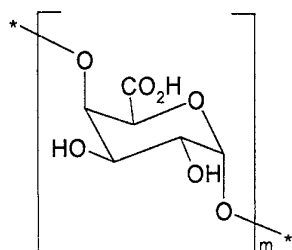
20

Le groupe des celluloses est constitué des celluloses fonctionnalisées par des acides comme la carboxyméthylcellulose.

Dans un mode de réalisation, les polysaccharides sont choisis
25 dans le groupe constitué par les dextrans, les hyaluronanes, les alginates, les chitosans.

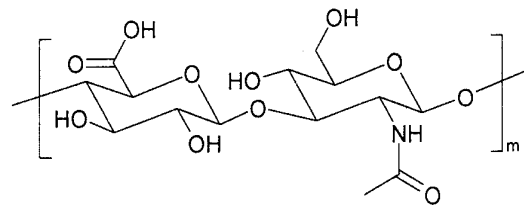
Ces différents polysaccharides peuvent être représentés comme
suit :

30



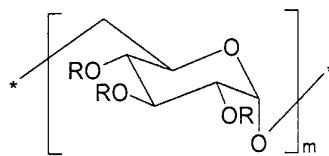
10

Galacturonane

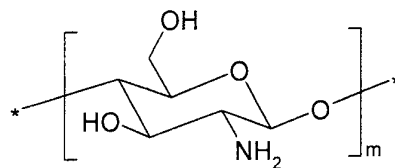


Hyaluronane

5

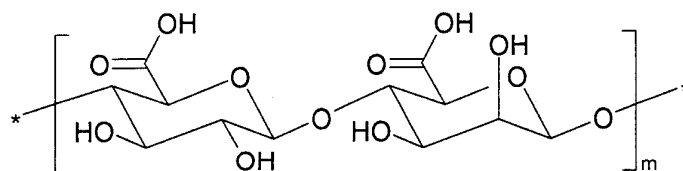


R = H, Dextran

R = CH_2COOH ou H, Carboxymethyl Dextran

10

Chitosan



Alginate

15 Le polysaccharide peut avoir un degré de polymérisation moyen m compris entre 10 et 10000.

Dans un mode de réalisation, il a un degré de polymérisation moyen m compris entre 10 et 5000.

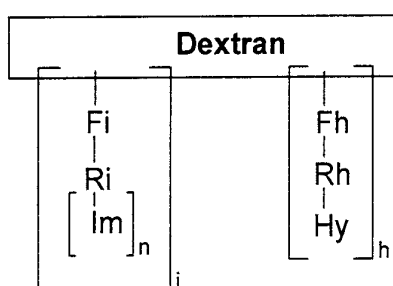
20 Dans un autre mode de réalisation, il a un degré de polymérisation moyen m compris entre 10 et 500.

Dans un mode de réalisation, le groupe hydrophobe Hy est choisi dans le groupe constitué par les acides gras, les alcools gras, les amines grasses, les amines benzyliques, les dérivés du cholestérol et les phénols.

5 Dans un mode de réalisation, le dérivé du cholestérol est l'acide cholique.

Dans un autre mode de réalisation, le phénol est l'alpha-tocophérol.

10 Le dextran bifonctionnalisé peut répondre aux formules générales suivantes :

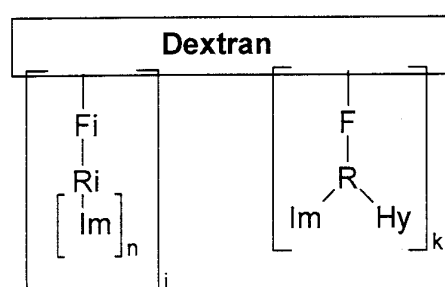


15 Formule II

n est compris entre 1 et 3,

i représente la fraction molaire de radical imidazolyne par rapport à une unité monosaccharidique, comprise entre 0.1 et 0.9,

20 h représente la fraction molaire de groupement hydrophobe par rapport à une unité monosaccharidique comprise entre 0.01 et 0.5.



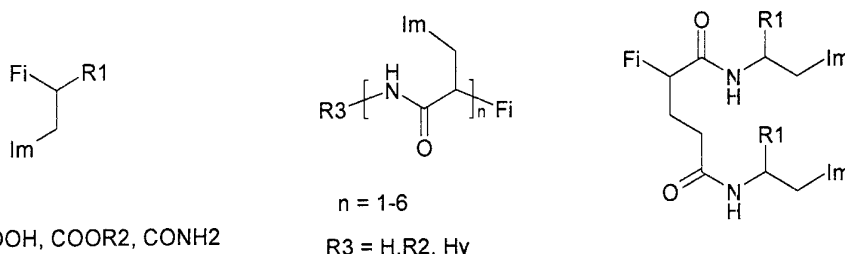
25 Formule III

n est compris entre 1 et 3,

i représente la fraction molaire de radical imidazole par rapport à une unité monosaccharidique, comprise entre 0 et 0.9,

5 k représente la fraction molaire de groupement hydrophobe par rapport à une unité monosaccharidique comprise entre 0.01 et 0.5.

Dans un mode de réalisation, dans les formules II et III, le dextran est caractérisé en ce que le groupe Ri, lorsqu'il n'est pas une liaison est choisi
10 dans les groupes suivants :



$R_1 = H, COOH, COOR_2, CONH_2$

$R_3 = H, R_2, Hy$

R2 étant choisi parmi les radicaux alkyle comprenant de 1 à 18 atomes de carbone.

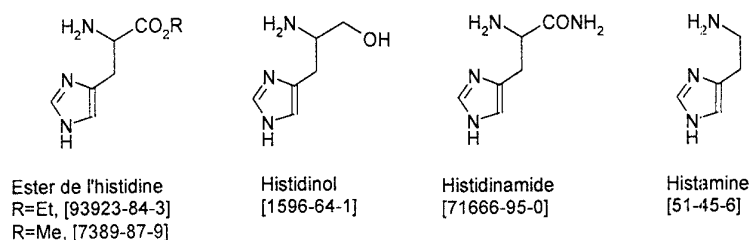
15

Dans un mode de réalisation, le dextran des formules II et III est caractérisé en ce que le groupe Ri est une liaison.

Dans un mode de réalisation, le dextran des formules II et III est
20 caractérisé en ce que le groupement Imidazole-Ri est choisi parmi les groupements obtenus par greffage d'un ester de l'histidine, de l'histidinol, de l'histidinamide ou de l'histamine.

Ces dérivés de l'imidazole peuvent être représentés comme suit :

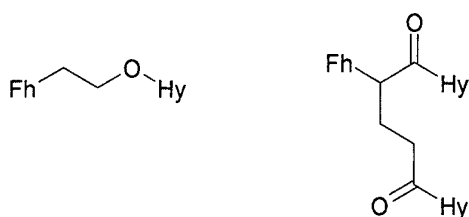
25



Dans un mode de réalisation, le dextran des formules II et III est caractérisé en ce que Hy sera choisi dans le groupe constitué par les acides gras, les alcools gras, les amines grasses, les dérivés du cholestérol dont l'acide cholique, les phénols dont l'alpha-tocophérol.

5

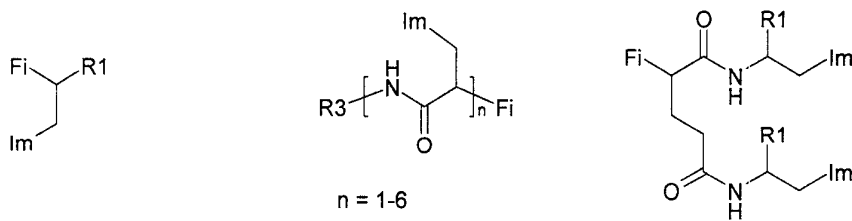
Dans un mode de réalisation, le dextran des formules II et III est caractérisé en ce que le groupe Rh, lorsqu'il n'est pas une liaison est choisi dans les groupes :



10

Dans un mode de réalisation, le dextran des formules II et III est caractérisé en ce que le groupe Rh est une liaison.

15 Dans un mode de réalisation, le dextran des formules II et III est caractérisé en ce que le groupe Ri, lorsqu'il n'est pas une liaison, est choisi dans les groupes



R1 = H, COOH, COOR2, CONH2

n = 1-6
R3 = H, R2, Hy

20 R2 étant choisi parmi les radicaux alkyle comprenant de 1 à 18 atomes de carbone et le groupe Rh est une liaison.

25 Dans un mode de réalisation, le dextran des formules II et III est caractérisé en ce que le groupement Imidazole-Ri est choisi parmi les esters de l'histidine, l'histidinol, l'histidinamide ou l'histamine et en ce que Hy sera choisi dans le groupe constitué par les acides gras, les alcools gras, les amines grasses, les dérivés du cholestérol dont l'acide cholique, les phénols dont l'alpha-tocophérol.

Le dextran des formules II et III peut avoir un degré de polymérisation m compris entre 10 et 10000.

Dans un mode de réalisation, il a un degré de polymérisation m
5 compris entre 10 et 1000.

Dans un autre mode de réalisation, il a un degré de polymérisation m compris entre 10 et 500.

10 Les polymères utilisés sont synthétisés selon les techniques connues de l'Homme de l'art ou achetés auprès de fournisseurs comme par exemple Sigma-Aldrich, NOF Corp. ou CarboMer Inc.

Les PDGF sont choisis parmi les PDGF recombinants humains,
15 obtenus selon les techniques connues de l'Homme de l'art ou achetés auprès de fournisseurs comme par exemple auprès des sociétés Gentaur (USA) ou Research Diagnostic Inc. (USA).

La composition pharmaceutique selon l'invention est de préférence
20 une composition à application locale et/ou topique pouvant se présenter sous la forme d'un gel, de crème, d'une solution, d'un spray ou d'une pâte, ou d'un patch.

La nature des excipients susceptibles d'être formulés avec le complexe polymère amphiphile-PDGF selon l'invention est choisie en fonction
25 de sa forme de présentation selon les connaissances générales du galéniste.

Ainsi, lorsque la composition selon l'invention est sous la forme d'un gel, celui-ci est par exemple un gel réalisé à partir de polymères tels que les carboxyméthylcelluloses (CMC), les polymères vinyliques, les copolymères de type PEO-PPO, les polysaccharides, les PEO, les acrylamides ou les
30 dérivés d'acrylamides.

D'autres excipients peuvent être utilisés dans cette invention afin d'ajuster les paramètres de la formulation comme un tampon pour ajuster le pH, un agent permettant d'ajuster l'isotonicité, des conservateurs comme le parahydroxybenzoate de méthyle, le parahydroxybenzoate de propyle, le m-crésol, ou le phénol ou encore un agent anti-oxydant comme le chlorhydrate de
35 L-lysine.

Selon l'invention, la composition thérapeutique est caractérisée en ce qu'elle permet une administration de 10 µg à 10 mg par ml de PDGF.

Dans un autre mode de réalisation, la composition thérapeutique permet une administration de 100 à 1000 µg/ml.

5

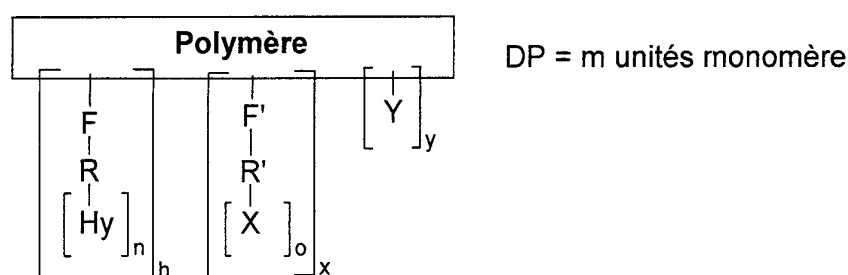
La présente invention concerne également l'utilisation d'un complexe polymère amphiphile-PDGF tel que précédemment défini pour la préparation d'une composition thérapeutique à action angiogénique.

10 L'invention concerne également une méthode de traitement thérapeutique à usage humain ou vétérinaire caractérisée en ce qu'elle consiste à administrer localement une composition thérapeutique angiogénique comprenant un complexe polymère PDGF caractérisé en ce que le polymère est amphiphile.

15 Dans un mode de réalisation, le PDGF est choisi dans le groupe des PDGFs (Platelet-Derivated Growth Factors).

Dans un autre mode de réalisation, le polymère amphiphile est choisi dans le groupe :

20 - des polymères amphiphiles constitués d'un squelette polymérique hydrophile fonctionnalisé par des substituants hydrophobes et des groupements hydrophiles de formule générale I.



25

formule I

dans laquelle,

- R et R' identiques ou différents représentent une liaison ou une chaîne comprenant entre 1 et 18 carbones, linéaire, branchée et/ou insaturée comprenant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes, choisis

30

parmi O, N ou/et S,

- F et F' identiques ou différents représentent une fonction choisie parmi les fonction suivantes ester, thioester, amide, carbonate, carbamate, éther, thioéther ou amine,
 - X représente un groupe hydrophile choisi dans le groupe constitué par les groupes suivants :
 - carboxylate
 - sulfate
 - sulfonate
 - phosphate
 - phosphonate
 - Y représente un groupe hydrophile choisi dans le groupe constitué par les groupes suivants :
 - sulfate
 - sulfonate
 - phosphate
 - phosphonate
 - Hy représente hydrophobe choisi dans le groupe constitué par les groupes suivants :
 - alkyle linéaire ou ramifié en C8 à C30, éventuellement insaturé et/ou contenant un ou plusieurs hétéroatomes, choisis parmi O, N ou S.
 - alkylaryl ou arylalkyle linéaire ou ramifié en C8 à C18, éventuellement insaturé et/ou contenant un ou plusieurs hétéroatomes, choisis parmi O, N ou S.
 - polycycle en C8 à C30 éventuellement insaturé.
- n et o sont compris entre 1 et 3,
 h représente la fraction molaire de motif hydrophobe par rapport à une unité monomérique comprise entre 0.01 et 0.5
 x représente la fraction molaire de groupements hydrophiles par rapport à une unité monomérique, comprise entre 0 et 2.0.

y représente la fraction molaire de groupements hydrophiles par rapport à une unité monomérique, comprise entre 0 et 0.5.

- ou dans le groupe des dextrans bifonctionnalisés par au moins un radical imidazolyle Im et au moins un groupement hydrophobe Hy, lesdits radical et groupement étant chacun, identique et/ou différent, et, greffés ou liés au dextran par un ou plusieurs bras de liaison R, Ri ou Rh et fonctions F, Fi ou Fh,

- 10
- R étant une liaison ou une chaîne comprenant entre 1 et 18 carbones, éventuellement branchée et/ou insaturée comprenant un ou plusieurs hétéroatomes, tels que O, N ou/et S,

R sera dénommé Ri dans le cas des imidazoles et Rh dans le cas des hydrophobes, Ri et Rh étant identiques ou différents,

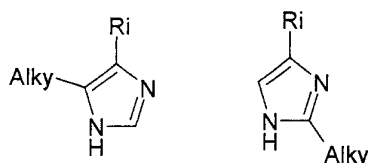
15

- F étant un ester, un thioester, un amide, un carbonate, un carbamate, un éther, un thioéther, une amine,

F sera dénommé Fi dans le cas des imidazoles et Fh dans le cas des hydrophobes, Fi et Fh étant identiques ou différents.

20

- Im étant un radical imidazolyle, éventuellement substitué sur l'un des carbones par un groupement alkyle (Alky) en C1 à C4, de formule



25

- Hy étant un groupement hydrophobe pouvant être :
 - un alkyle linéaire ou ramifié en C8 à C30, éventuellement insaturé et/ou contenant un ou plusieurs hétéroatomes, tels que O, N ou S.
 - un alkylaryle ou un arylalkyle linéaire ou ramifié en C8 à C30, éventuellement insaturé et/ou contenant éventuellement un hétéroatome

30

- un polycycle en C8 à C30 éventuellement insaturé.

Des exemples de préparation, des différents complexes selon l'invention sont décrits dans la demande de brevet IB 2006/002666 au nom de
5 la demanderesse.

L'utilisation selon l'invention permet d'obtenir des résultats qui sont dits dose-dépendants en terme d'angiogénèse.

10 L'activité angiogénique surprenante obtenue par l'utilisation selon l'invention est démontrée dans les exemples qui suivent :

Exemples :

15

A Préparation des polymères amphiphiles

Exemple 1 :

20 Synthèse du carboxyméthyl dextran sulfaté modifié par la benzylamine (DMCBSu)

Le polymère amphiphile est synthétisé à partir d'un carboxyméthyl dextran ayant un degré de substitution en carboxyméthyl par unité
25 saccharidique de 1.0 et une masse molaire moyenne de 40000 g/mol. La benzylamine est greffée sur les acides de ce polymère selon une méthode classique de couplage dans l'eau en présence d'un carbodiimide hydrosoluble. Le degré de substitution en benzylamine par unité saccharidique est de 0.4, déterminé par RMN ¹H. Ce polymère est ensuite sulfaté par un complexe
30 SO₃/pyridine. Le degré de substitution en sulfate par unité saccharidique est de 0.3.

Exemple 2 :Synthèse du carboxyméthyl dextran modifié par l'ester méthylique du tryptophane (DMCTrpOMe)

5

Le polymère amphiphile est synthétisé à partir d'un carboxyméthyl dextran ayant un degré de substitution en carboxyméthyl par unité saccharidique de 1.0 et une masse molaire moyenne de 40000 g/mol. L'ester méthylique du tryptophane est greffé sur les acides de ce polymère selon une méthode classique de couplage dans l'eau en présence d'un carbodiimide hydrosoluble. Le degré de substitution en tryptophane par unité saccharidique est de 0.3 déterminé par RMN ^1H .

Exemple 3 :

15

Synthèse de la carboxyméthyl cellulose sulfatée modifiée par la benzylamine (CMCBSu)

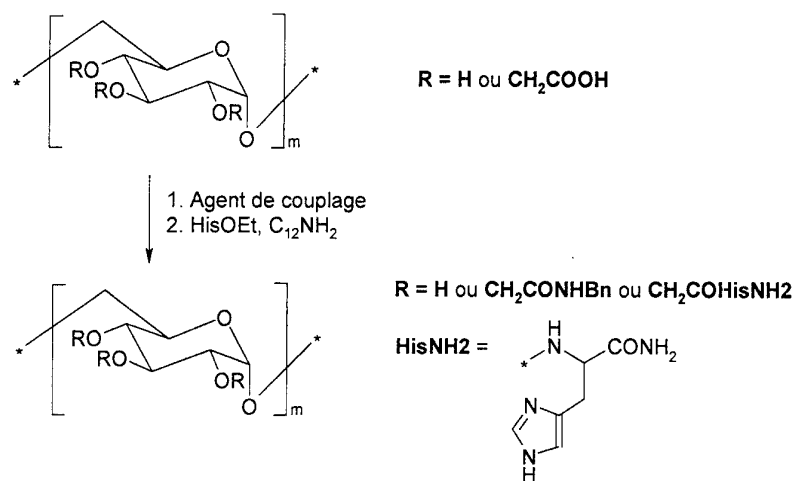
Le polymère amphiphile est synthétisé à partir d'une carboxyméthyl cellulose ayant un degré de substitution en carboxyméthyl par unité saccharidique de 1.2 et une masse molaire moyenne de 30000 g/mol. La benzylamine est greffée sur les acides de ce polymère selon une méthode classique de couplage dans l'eau en présence d'une carbodiimide hydrosoluble. Le degré de substitution en benzylamine par unité saccharidique est de 0.2 déterminé par RMN ^1H . La sulfatation est réalisée en présence d'un complexe $\text{SO}_3\text{-Pyridine}$, le degré de substitution en sulfate est de 0.30.

Exemple 4 :

Synthèse d'un carboxymethyldextran modifié par l'histidinamide et la benzylamine

30

Les fonctions acides (degré moyen de 1.0 par unité glycosidique) d'un carboxymethyldextran sont activées en présence de N-MéthylMorpholine et de chloroformate d'isobutyl dans la NMP. L'histidinamide puis la benzylamine sont greffés sur ce polymère activé. Le polymère obtenu a la structure suivante.



5

Le taux de fonctions acides modifiées par :

-l'histidinamide est de 55%,

-la benzylamine est de 45%

Le taux d'acides non modifiés est nul.

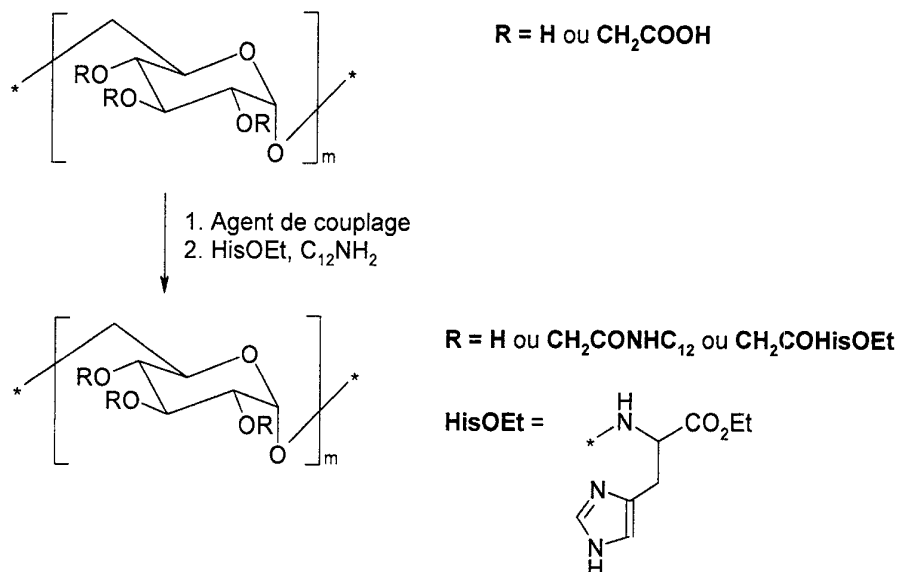
Exemple 5 :

10 Synthèse d'un carboxymethyldextran modifié par l'ester éthylique de l'histidine et la dodécylamine

Les fonctions acides (degré moyen de 1.0 par unité glycosidique) d'un carboxymethyldextran sont activées en présence de N-MéthylMorpholine et de

15 chloroformate d'isobutyl dans la NMP. L'ester éthylique de l'histidine puis la dodécylamine sont greffés sur ce polymère activé. Le polymère obtenu a la structure suivante.

21



Le taux de fonctions acides modifiées par :

- l'ester éthylique d'histidine est de 85%
- la dodécylamine est de 10%

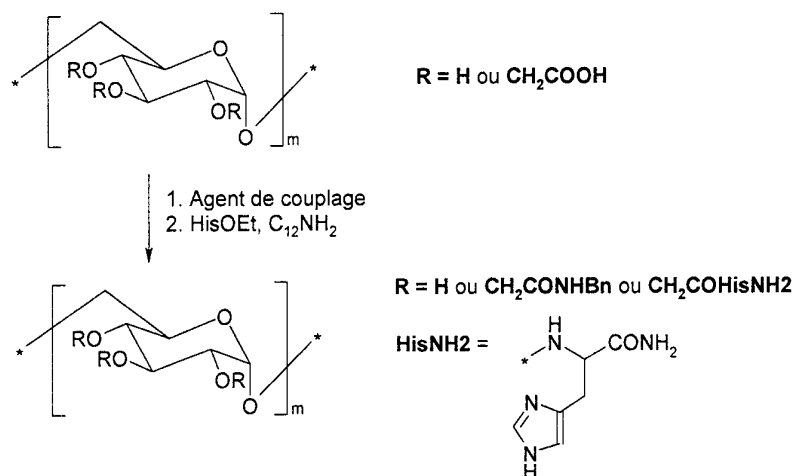
Le taux d'acides non modifiés est de 5%.

Exemple 6 :

Synthèse d'un carboxymethyldextran modifié par l'histidinamide et la benzylamine

Les fonctions acides (degré moyen de 1.0 par unité glycosidique) d'un carboxymethyldextran sont activées en présence de N-MéthylMorpholine et de chloroformate d'isobutyl dans la NMP. L'histidinamide puis la benzylamine sont greffés sur ce polymère activé. Le polymère obtenu a la structure suivante.

22



Le taux de fonctions acides modifiées par :

-l'histidinamide est de 65%,

-la benzylamine est de 30%

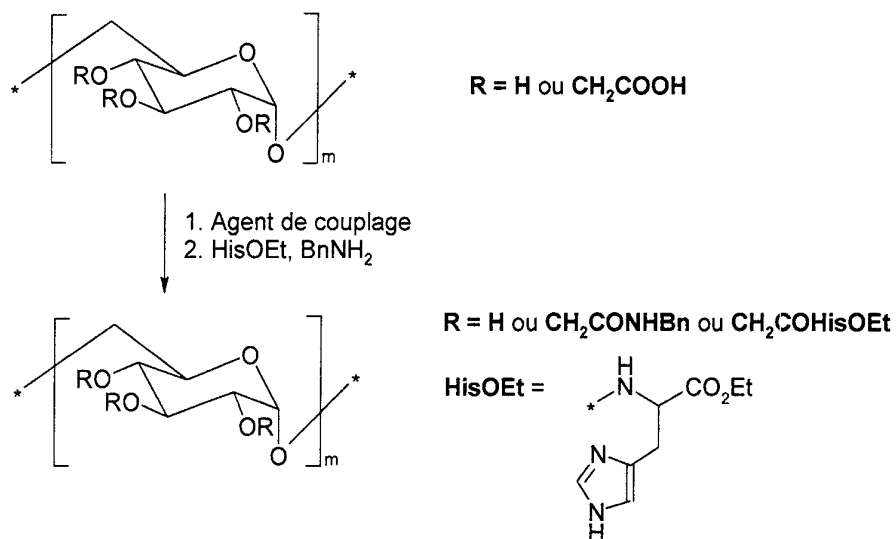
Le taux d'acides non modifiés est de 5%.

Exemple 7 :

Synthèse d'un carboxymethyldextran modifié par l'ester éthylique de l'histidine et la benzylamine

Les fonctions acides (degré moyen de 1.0 par unité glycosidique) d'un carboxymethyldextran sont activées en présence de N-MéthylMorpholine et de chloroformate d'isobutyl dans le DMF à 0°C. L'ester éthylique de l'histidine et la benzylamine sont greffés sur ce polymère activé. Le polymère obtenu a la structure suivante.

23



Le taux de fonctions acides modifiées par :

-l'ester éthylique de l'histidine est de 10%,

-la benzylamine est de 45%

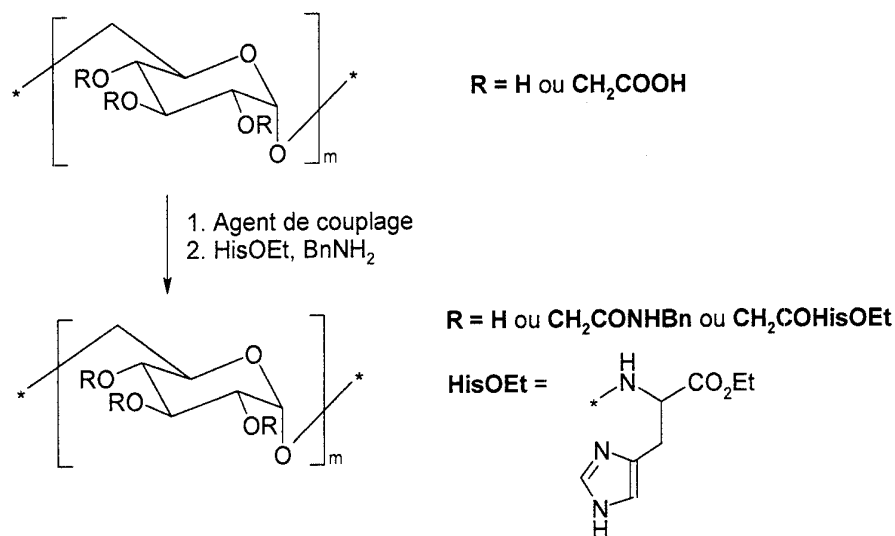
Le taux d'acides non modifiés est de 45%.

Exemple 8 :

Synthèse d'un carboxymethyldextran modifié par l'ester éthylique de l'histidine et la benzylamine

Les fonctions acides (degré moyen de 1.0 par unité glycosidique) d'un carboxymethyldextran sont activées en présence de N-MéthylMorpholine et de chloroformate d'isobutyl dans le DMF à 0°C. L'ester éthylique de l'histidine (0,2 équivalent par rapport aux acides) et la benzylamine (0,45 équivalent par rapport aux acides) sont greffés sur ce polymère activé. Le polymère obtenu a la structure suivante.

24



5

Le taux de fonctions acides modifiées par :

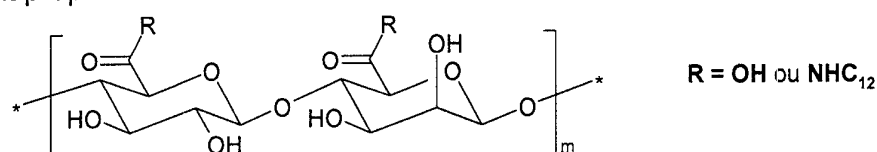
- l'ester éthylique de l'histidine est de 20%,
- la benzylamine est de 45%

Le taux d'acides non modifiés est de 35%.

Exemple 9 :

Synthèse d'un alginate modifié par la dodécylamine

- 10 Produit préparé selon le brevet FR2781677 et dont la formule est la suivante.



Le taux de fonctions acides modifiées par :

La dodécylamine est de 10%.

15

B Préparation des complexes

Les complexes sont obtenus par mélange d'une solution aqueuse de PDGF-BB d'une concentration comprise entre 0,5 et 2 mg/ml et d'une solution de polymère amphiphile d'une concentration comprise entre 20 et 150 mg/ml. Les

solutions sont tamponnées au pH de formulation du complexe et l'osmolarité est fixée à 300 mOsm.

A titre d'exemple, on obtient :

- 5 • Le complexe PDGF-BB avec le polymère décrit à l'exemple 1 à pH 7.4
- Le complexe PDGF-BB avec le polymère décrit à l'exemple 4 à pH 4
- Le complexe PDGF-BB avec le polymère décrit à l'exemple 8 à pH 7.4

10 **C Démonstration de l'activité angiogénique des complexes**

L'activité angiogénique surprenante obtenue par l'utilisation selon l'invention est démontrée dans les exemples qui suivent :

Préparation de la formulation

15 Une solution de PDGF-BB est préparée à 2 mg/ml, à pH 7,4 et 300 mOsm et une solution de polymère amphiphile est préparée à 67 mg/ml à pH 7,4 et 300 mOsm. Ces solutions sont mélangées à température ambiante dans la proportion 1/3 pour obtenir une formulation de complexe PDGF-BB/Polymère amphiphile.

20 Exemple 1 : Effet angiogénique de la formulation de complexe de PDGF-BB comparée à la formulation simple de PDGF-BB

Les essais *in vivo* ont été effectués sur des plaies de rat diabétique *db/db*. Le premier jour, deux excisions de 2,5x2,5 cm² ont été faites sur le dos du rat. Selon le protocole, sur ces plaies, les formulations ont été appliquées tous les 2 jours pendant 22 jours, après un nettoyage de la plaie. Le groupe de référence est traité par la formulation de PDGF-BB sous forme de gel, il s'agit du produit Regranex® commercialisé par Johnson&Johnson, avec une dose par application de 500 µl. Le groupe traité avec le complexe de PDGF-BB a

25

30 recu une dose équivalente avec 100 µl.

Le score hémorragique est évalué par une observation visuelle sur une échelle linéaire qualitative de 0 à 4, 0 représentant l'absence de saignement et 4 un saignement maximum. Au 8^{ème} jour après l'excision et le début du traitement, ce score atteint en moyenne 2,8 pour le groupe traité avec

35 le complexe de PDGF-BB contre 1,3 pour le groupe traité avec Regranex à la

même dose de PDGF-BB. Cette différence est significative d'un point de vue statistique. Cette propriété macroscopique est la signature du pouvoir angiogénique supérieur du complexe de PDGF-BB comparativement au PDGF-BB non complexé.

5 Cette hémorragie de 2,8 en moyenne dans le groupe traité par le complexe de PDGF-BB a nécessité l'interruption de ce traitement après 4 applications alors que le traitement avec le Regranex a pu être poursuivi jusqu'au 22^{ème} jour comme prévu.

10 Exemple 2 : Effet angiogénique dépendant de la dose de PDGF-BB pour le complexe de PDGF-BB

Les essais *in vivo* ont été effectués sur des plaies de rat diabétique *db/db*. Le premier jour, deux excisions de 2,5x2,5 cm² ont été faites sur le dos du rat. Sur ces plaies, une même formulation de complexe de PDGF-BB telle
15 que ci-dessus décrite, a été appliquée selon 2 protocoles différents. Le groupe 1 consiste en 2 applications aux jours 0 et 2 puis les plaies ont été nettoyées avec une solution saline tous les 2 jours pendant 16 jours. Le groupe 2 consiste en 4 applications aux jours 0, 2, 4 et 6 puis les plaies ont été nettoyées avec une solution saline tous les 2 jours pendant 16 jours. Tous les
20 2 jours, les plaies ont reçu 100 µl soit de la formulation, soit de solution saline.

Au 10^{ème} jour après l'excision et le début du traitement, le score hémorragique atteint en moyenne 2,2 pour le groupe traité 4 fois avec le complexe de PDGF-BB contre 1,4 pour le groupe traité 2 fois avec le même complexe de PDGF-BB. Cette différence est significative d'un point de vue
25 statistique. Le complexe de PDGF-BB permet de révéler une activité angiogénique dépendant de la dose appliquée contrairement au Regranex pour lequel aucun effet dose n'est rapporté dans la littérature.

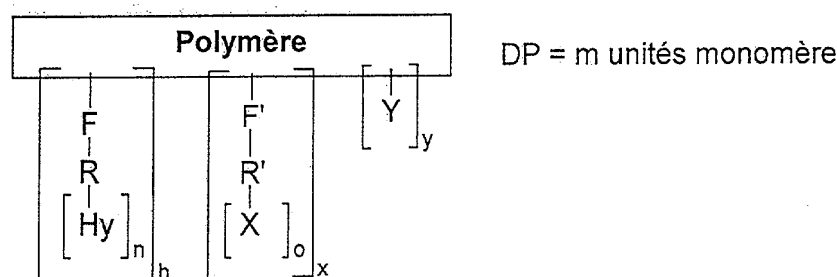
Revendications

1. Utilisation d'un polymère amphiphile pour la préparation d'une composition thérapeutique destinée à favoriser l'angiogénèse sur son site d'administration comprenant un complexe entre un polymère et un PDGF caractérisée en ce que le polymère est amphiphile.

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le PDGF est choisi dans le groupe des PDGFs (Platelet-Derivated Growth Factors).

3. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que le polymère amphiphile est choisi dans le groupe :

- des polymères amphiphiles constitués d'un squelette polymérique hydrophile fonctionnalisé par des substituants hydrophobes et des groupements hydrophiles de formule générale I.



formule I

dans laquelle,

- R et R' identiques ou différents représentent une liaison ou une chaîne comprenant entre 1 et 18 carbones, linéaire, branchée et/ou insaturée comprenant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes, choisis parmi O, N ou/et S,
- F et F' identiques ou différents représentent une fonction choisie parmi les fonctions suivantes ester, thioester, amide, carbonate, carbamate, éther, thioéther ou amine,
- X représente un groupe hydrophile choisi dans le groupe constitué par les groupes suivants :

- o carboxylate

- sulfate
 - sulfonate
 - phosphate
 - phosphonate
- 5 • Y représente un groupe hydrophile choisi dans le groupe constitué par les groupes suivants :
- sulfate
 - sulfonate
 - phosphate
 - 10 ○ phosphonate
- Hy représente un groupe hydrophobe choisi parmi les groupes suivants :
- alkyle linéaire ou ramifié en C8 à C30, éventuellement insaturé et/ou contenant un ou plusieurs hétéroatomes, choisis parmi O, N ou S.
 - 15 ○ alkylaryl ou arylalkyle linéaire ou ramifié en C8 à C18, éventuellement insaturé et/ou contenant un ou plusieurs hétéroatomes, choisis parmi O, N ou S.
 - polycycle en C8 à C30 éventuellement insaturé.
- 20 n et o sont compris entre 1 et 3,
h représente la fraction molaire de motif hydrophobe par rapport à une unité monomérique comprise entre 0.01 et 0.5
x représente la fraction molaire de groupements hydrophiles par rapport à une unité monomérique, comprise entre 0 et 2.0.
25 y représente la fraction molaire de groupements hydrophiles par rapport à une unité monomérique, comprise entre 0 et 0.5.
- ou dans le groupe des dextrans bifonctionnalisés par au moins un radical imidazole Im et au moins un groupement hydrophobe Hy, lesdits radical et groupement étant chacun, identiques et/ou différents, et, greffés ou
- 30

liés au dextran par un ou plusieurs bras de liaison R, Ri ou Rh et fonctions F, Fi ou Fh,

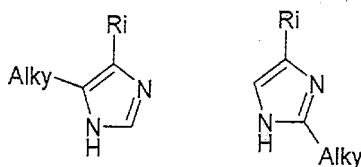
- 5
- R étant une liaison ou une chaîne comprenant entre 1 et 18 carbones, éventuellement branchée et/ou insaturée comprenant un ou plusieurs hétéroatomes, tels que O, N ou/et S,

R sera dénommé Ri dans le cas des imidazoles et Rh dans le cas des hydrophobes, Ri et Rh étant identiques ou différents,

- 10
- F étant un ester, un thioester, un amide, un carbonate, un carbamate, un éther, un thioéther, une amine,

F sera dénommé Fi dans le cas des imidazoles et Fh dans le cas des hydrophobes, Fi et Fh étant identiques ou différents.

- 15
- Im étant un radical imidazolyle, éventuellement substitué sur l'un des carbones par un groupement alkyle (Alky) en C1 à C4, de formule



- Hy étant un groupement hydrophobe pouvant être :
 - 20 un alkyle linéaire ou ramifié en C8 à C30, éventuellement insaturé et/ou contenant un ou plusieurs hétéroatomes, tels que O, N ou S.
 - un alkylaryle ou un arylalkyle linéaire ou ramifié en C8 à C30, éventuellement insaturé et/ou contenant éventuellement un hétéroatome
 - 25 un polycycle en C8 à C30 éventuellement insaturé.

4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications
30 précédentes, caractérisée en ce que le PDGF est choisi dans le groupe

constitué par les PDGFs recombinants humains comportant deux chaînes B (rhPDGF-BB).

5 5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le PDGF est le PDGF-BB.

6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle permet une administration de 10 µg à 10 mg par ml de PDGF.

10

7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la composition thérapeutique est sous forme d'un gel, d'une crème, d'une solution, d'un spray, d'une pâte ou d'un patch.



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 695187
FR 0702314

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 02/058718 A (GENETIX PHARMACEUTICALS INC [US]; PAWLIUK ROBERT [US]; LEBOULCH PHILIP) 1 août 2002 (2002-08-01) * page 6, ligne 5 - ligne 22 *	1,2,4-7	A61K47/36 A61K38/18 A61K47/42 A61P9/10
Y	* exemple 4 * * revendications 1,7,11 * * figure 7 *	3	
X	US 5 457 093 A (CINI JOHN K [US] ET AL) 10 octobre 1995 (1995-10-10) * colonne 2, ligne 64 - colonne 3, ligne 8 * * colonne 6, ligne 44 - ligne 57 * * exemples 7,8 *	1,2,4-7	
Y	CARION O ET AL: "Polysaccharide microarray for polysaccharide-PDGF interaction studies" CHEMBIOCHEM, WILEY, WEINHEIM, DE, vol. 7, 7 mai 2006 (2006-05-07), pages 817-826, XP002441279 ISSN: 1439-4227 * abrégé * * schéma 1 * * tableau 1 * * page 820, colonne 1, alinéa 2 *	3	
D,E	WO 2007/034320 A (PROTEINS & PEPTIDES MAN [FR]; DUBREUCQ GUY [FR]; DAHRI-CORREIA LATIFA) 29 mars 2007 (2007-03-29) * page 6, ligne 14-22 * * page 18, ligne 1-3,18,19 * * exemples * * revendications *	1-7	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) A61K A61P
----- -/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
24 octobre 2007		Villard, Anne-Laure	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 695187
FR 0702314

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
E	FR 2 891 149 A (BIODEX SARL [FR]) 30 mars 2007 (2007-03-30) * page 5, ligne 7-21 * * exemple 1 * * revendications * -----	1-7	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
24 octobre 2007		Villard, Anne-Laure	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0702314 FA 695187

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

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **24-10-2007**

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

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 02058718 A	01-08-2002	CA 2436076 A1 EP 1355659 A2 JP 2005506279 T	01-08-2002 29-10-2003 03-03-2005
US 5457093 A	10-10-1995	AUCUN	
WO 2007034320 A	29-03-2007	FR 2891149 A1 WO 2007034321 A2	30-03-2007 29-03-2007
FR 2891149 A	30-03-2007	WO 2007034320 A2 WO 2007034321 A2	29-03-2007 29-03-2007