

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
7 juillet 2005 (07.07.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2005/061549 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
**C08B 37/00**, A61K 31/737

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2004/003226

(22) Date de dépôt international :  
15 décembre 2004 (15.12.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
0314986 19 décembre 2003 (19.12.2003) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **AVEN-  
TIS PHARMA S.A.** [FR/FR]; 20 Avenue Raymond Aron,  
F-92160 ANTONY (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **ULMER,**

**Wolfgang** [DE/DE]; Unter den Ulmen 6, 65817 EPP-  
STEIN (DE). **VISKOV, Christian** [FR/FR]; 3 rue du  
Béarn, F-91130 RIS ORANGIS (FR). **HUBERT, Philippe**  
[FR/FR]; Résidence Les Jardins des Juilliottes, 22 rue  
Georges Gaume, F-94700 MAISONS-ALFORT (FR).

(74) Mandataire : **ROUSSEAU, Pierick**; Aventis Pharma  
S.A., Direction Brevets, 20 Avenue Raymond Aron,  
F-92165 Antony Cedex (FR).

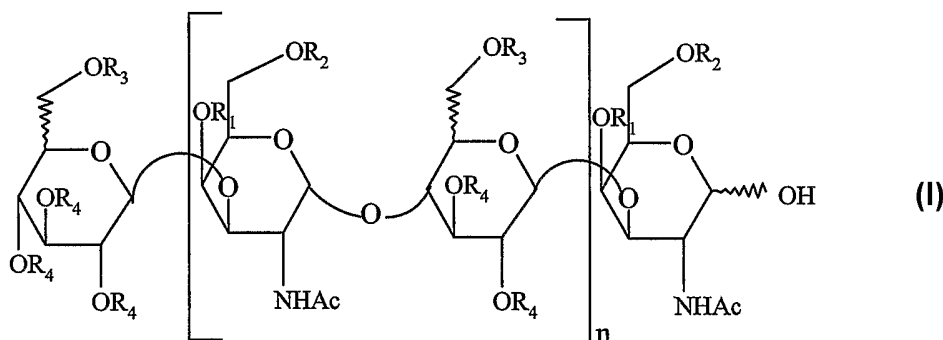
(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,  
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,  
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,  
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,  
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,  
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre  
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: CARBOXY-REDUCED DERIVATIVES OF DERMATAN SULPHATE, METHOD OF PREPARING SAID DERIVA-  
TIVES, APPLICATION THEREOF AS A MEDICAMENT AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING SAME

(54) Titre : DERIVES CARBOXY-REDUITS DU DERMATAN SULFATE, LEUR PREPARATION, LEUR APPLICATION  
COMME MEDICAMENT ET LES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES RENFERMANT



(57) Abstract: The invention relates to: carboxy-reduced derivatives of dermatan sulphate having formula (I), wherein R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> or R<sub>4</sub> represent H or SO<sub>3</sub>M, n is an integer of between 0 and 150 and M is an alkali metal, said derivatives being isolated or in mixtures; the diastereoisomers of said derivatives; the preparation method thereof; the applications thereof as a medicament; and pharmaceutical compositions containing same.

(57) Abrégé : La présente invention concerne les dérivés carboxy-réduits du Dermatan Sulfate de formule (I) : dans laquelle R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> ou R<sub>4</sub> représentent H ou SO<sub>3</sub>M, n est un entier compris entre 0 et 150, M est un métal alcalin, isolés ou en mélanges, leurs diastéréoisomères, leur procédé de préparation, leurs applications à titre de médicament et les compositions pharmaceutiques les contenant.

WO 2005/061549 A1



européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publiée :**

— avec rapport de recherche internationale

— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

DERIVES CARBOXY-REDUITS DU DERMATAN SULFATE, LEUR  
PREPARATION, LEUR APPLICATION COMME MEDICAMENT ET LES  
COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES RENFERMANT

La présente invention concerne de nouveaux Glycosaminoglycanes ainsi que leurs sels d'addition pharmaceutiquement acceptables et plus précisément des dérivés carboxy-réduits et chemiosélectivement O-sulfatés du Dermatan Sulfate, isolés ou en mélange, leur application à titre de médicament et les compositions pharmaceutiques les contenant.

Les Glycoaminoglycanes (GAGs) sont essentiellement formés de motifs alternés acide uronique-sucre aminé (ou l'inverse), du type de ceux rencontrés dans les chaînes oligo ou polysaccharidiques de GAGs naturels biologiquement actifs comme l'héparine, l'heparane-sulfate, le dermatan-sulfate, les chondroïtines, les chondroïtines sulfates ou l'acide Hyaluronique.

Les motifs acides uronique répondent plus spécialement à la structure acide D-glucoronique ou L-iduronique et les motifs sucres aminés à celle de la D-galactosamine.

Les GAGs naturels présentent des activités thérapeutiques en tant qu'inhibiteurs de la Thrombine. Ils présentent donc une activité antithrombotique et anticoagulante et sont utilisés dans les pathologies cardiovasculaires dans lesquelles il y a un risque de thrombose.

Des dérivés O-persulfatés du Dermatan Sulfate ont été décrits et étudiés pour leurs propriétés anticoagulantes dans la demande de brevet FR FR2584728.

Par ailleurs, des dérivés O-persulfatés du Dermatan Sulfate ont été décrits et étudiés pour leurs propriétés

dans l'arthrite rhumatoïde dans la demande internationale WO 9213541-A1.

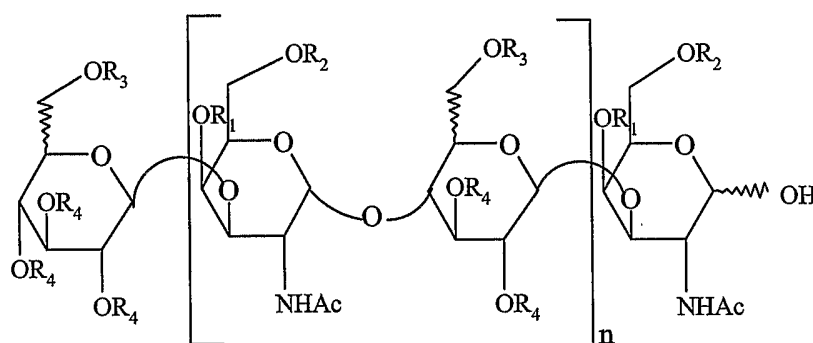
La présente invention a pour objet un nouveau procédé mettant en œuvre une étape de carboxy-réduction et une étape de sulfatation permettant d'obtenir de nouveaux dérivés carboxy-réduits et chemiosélectivement O-sulfatés du Dermatan Sulfate présentant des propriétés avantageuses permettant de traiter ou de prévenir des désordres qui affichent une activité accrue d'au moins une des métalloprotéinases de matrice.

Les dérivés carboxy-réduits et chemiosélectivement O-sulfatés du Dermatan Sulfate de formule (I) possèdent une structure polymérique très régulière avec des degrés de pureté de l'ordre de 90%. Il en résulte des propriétés biologiques reproductibles et inattendues.

Dans l'état pathologique de l'ostéoarthrose, la dégradation de l'aggrécan, le protéoglycane principal du cartilage articulaire, représente un événement très précoce et crucial. La perte pathologique de l'aggrécan est provoquée par des clivages protéolytiques dans son domaine interglobulaire. Les analyses de séquences d'acides aminés des métabolites de protéoglycanes isolés à partir du liquide synovial des patients souffrant de dommages articulaires, d'ostéoarthrose ou de désordre inflammatoire des articulations, ont montré qu'il existe un clivage protéolytique entre les acides aminés Glu<sup>373</sup> et Ala<sup>374</sup> dans le domaine interglobulaire de l'aggrécan humain (Lohmander, et al., *Arthritis Rheum.*, 36 : 1214-1222 (1993)). L'activité protéolytique responsable de ce clivage est dénommée "aggrécanase" et peut être attribuée à la superfamille des métalloprotéinases (MP) ou métalloprotéinases de matrice (MMP).

Le zinc est un élément essentiel dans le centre catalytiquement actif des métalloprotéinases. Les MMP clivent le collagène, la laminine, les protéoglycanes, l'élastine ou la gélatine dans des conditions physiologiques. Donc, elles jouent un rôle important dans le tissu osseux et conjonctif. Un grand nombre de différents inhibiteurs des MMP sont connus (voir, par exemple les demandes de brevet EP 0 606 046 ou WO94/28889). Toutefois, les inhibiteurs connus des MMP ont fréquemment un désavantage significatif. Ils manquent de spécificité pour toute classe particulière de MMP. Au contraire, la plupart des inhibiteurs de MMP inhibent simultanément une pluralité de MMP.

Par conséquent, il existe un besoin d'inhibiteurs de MMP ayant des spécificités plus étroitement définies afin de mieux traiter ou de prévenir des désordres spécifiques. L'invention a tout particulièrement pour objet les dérivés carboxy-réduits et sulfatés du Dermatan Sulfate de formule (I) :



dans laquelle  $R_1$  représente  $SO_3M$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  et  $R_4$ , identiques ou différents, représentent H ou  $SO_3M$ , étant entendu que l'un au moins des substituants  $R_2$ ,  $R_3$  et  $R_4$  représentent un groupement  $SO_3M$ ,  $n$  est un entier compris entre 0 et 150,  $M$  est un métal alcalin, les dits dérivés étant sous

la forme d'un composé isolé ou sous forme de mélanges, ainsi que leurs diastéréoisomères.

En particulier, l'invention a pour objet les dérivés carboxy-réduits du Dermatan Sulfate selon la formule (I) caractérisé en ce que le M est choisi parmi sodium, calcium, magnésium et potassium et en particulier Sodium.

L'invention a plus particulièrement pour objet les dérivés carboxy-réduits du Dermatan Sulfate tels que décrits plus haut caractérisés en ce que  $R_2$  et  $R_3$  représentent  $SO_3Na$  et  $R_4$  représente H.

L'invention a plus particulièrement pour objet les dérivés carboxy-réduits du Dermatan Sulfate tels que décrits plus haut caractérisés en ce que  $R_2$ ,  $R_3$  et  $R_4$  représentent  $SO_3Na$ .

L'invention a plus particulièrement pour objet les dérivés carboxy-réduits du Dermatan Sulfate tels que décrits plus haut caractérisés en ce que  $R_2$  et  $R_4$  représentent  $SO_3Na$  et  $R_3$  représente H.

L'invention a plus particulièrement pour objet les dérivés carboxy-réduits du Dermatan Sulfate tels que décrits plus haut caractérisés en ce que  $R_2$  représente  $SO_3Na$  et  $R_3$  et  $R_4$  représentent H.

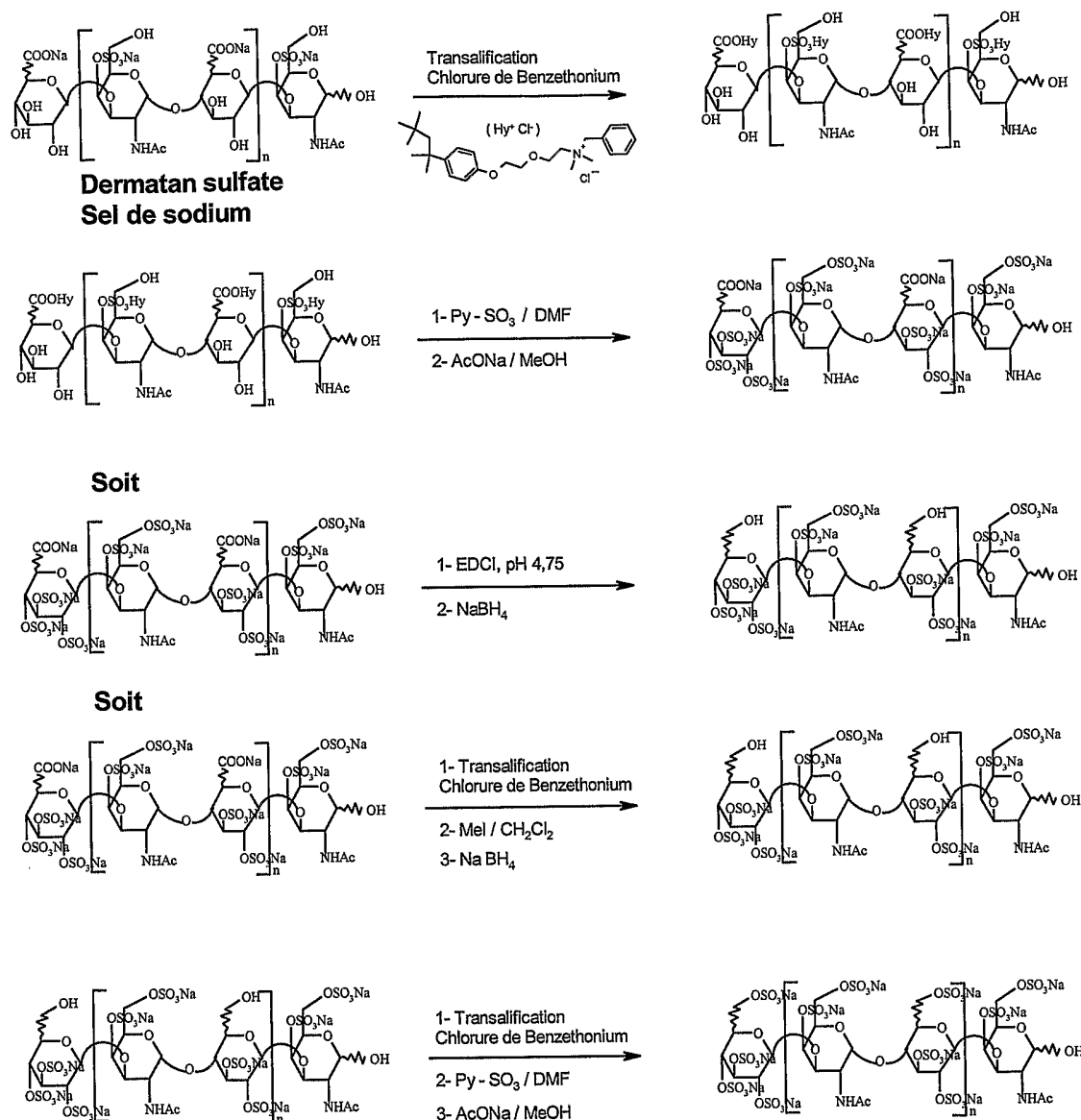
Ces polysaccharides comportent ainsi un nombre pair de saccharides.

De manière générale, les mélanges de polysaccharides selon l'invention peuvent être préparés d'une part par carboxy-réduction du Dermatan sulfate ou de ses dérivés, suivie d'une sulfatation chemiosélective ou inversement par sulfatation suivie d'une carboxy-réduction.

L'invention a donc pour objet les dérivés carboxy-réduits et sulfatés du Dermatan Sulfate tels que définis plus

haut mettant en oeuvre successivement les étapes suivantes :

- Trans-salification du Dermatan Sulfate par un sel d'ammonium quaternaire,
  - Sulfatation en milieu organique, suivie d'une salification,
  - Carboxy-réduction du dérivé persulfaté
    - soit a) au moyen d'un dérivé de carbodiimide ( pour former un adduit activé) et en présence d'un agent réducteur ,
    - soit b) par estérification, le dérivé persulfaté étant le cas échéant préalablement trans-salifié par un sel d'ammonium quaternaire, suivie d'une réduction du dérivé ester correspondant par action un agent réducteur
  - Le cas échéant, trans-salification du dérivé persulfaté carboxy-réduit par un sel d'ammonium quaternaire puis resulfatation suivie d'une salification.
- Le schéma réactionnel suivant illustre la présente invention :

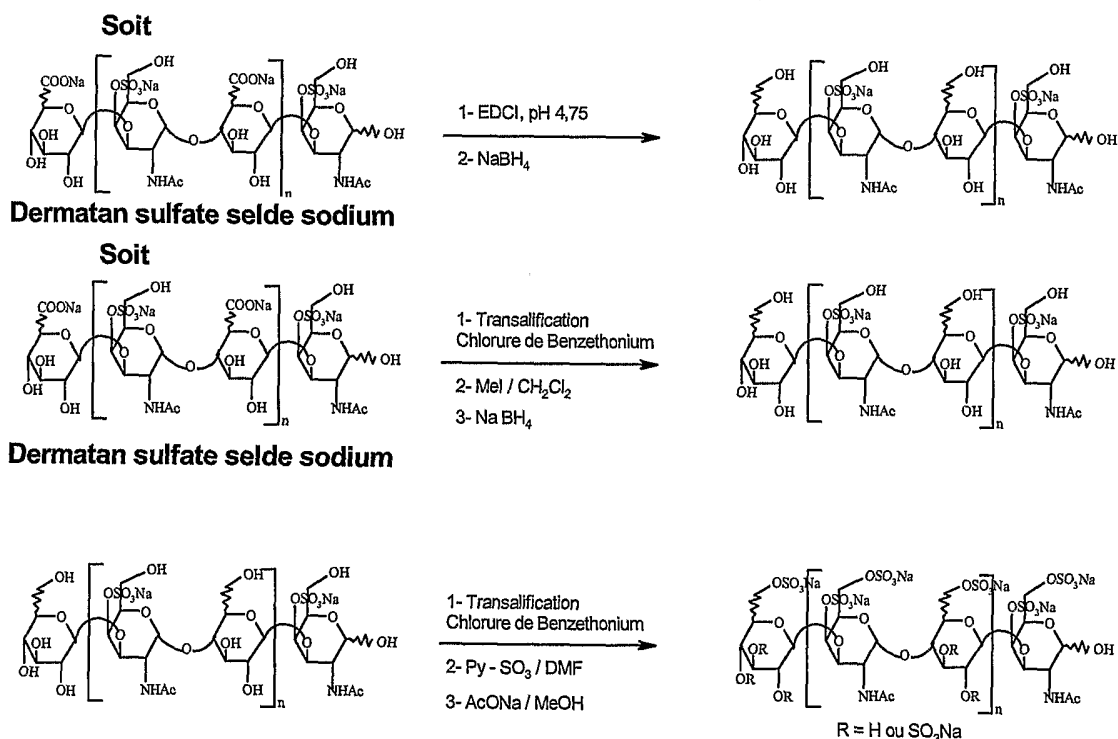


Le cas échéant, les dérivés carboxy-réduits du Dermatan Sulfate tels que définis plus haut peuvent être obtenus selon le procédé mettant en oeuvre les étapes sus décrites mais combinées dans un ordre inverse. Le procédé est alors le suivant :



- Carboxy-réduction du Dermatan Sulfate sel de Sodium
  - Soit a) au moyen d'un dérivé de carbodiimide ( pour former un adduit activé) et en présence d'un agent réducteur,
  - soit b) par estérification, le Dermatan Sulfate sel de sodium étant le cas échéant préalablement trans-salifié par un sel d'ammonium quaternaire, suivie d'une réduction du dérivé ester correspondant par action un agent réducteur,
- Trans-salification du dérivé carboxy-réduit par un sel d'ammonium quaternaire,
- Sulfatation en milieu organique suivie d'une salification.

Le schéma réactionnel suivant illustre la présente invention :



Le procédé selon la présente invention est caractérisé par la forte chemiosélectivité des réactions de carboxy-réduction et de sulfatation. Les produits qui en résultent sont remarquablement homogènes et conduisent à des polymères vrais. Les dérivés du Dermatan Sulfate carboxy-réduit possèdent des puretés de l'ordre de 90 %. Cette homogénéité est déterminée par analyse structurale RMN et Infrarouge.

Il en résulte des propriétés biologiques reproductibles et inattendues.

Les réactions de persulfatation s'effectuent de préférence en milieu organique au moyen d'un complexe d'anhydride sulfurique avec une base organique telle que la pyridine ou la triméthylamine. Elles sont suivies en général par une réaction de salification par exemple par action d'acétate de sodium.

Pour une chemiosélectivité optimale des réactions de persulfatation, il est préférable de mettre en oeuvre le sel de benzéthonium du Dermatan Sulfate, carboxy-réduit ou non, en présence de 10 à 30 équivalents de complexe pyridine - anhydride sulfurique par fonction hydroxyle à sulfater. De même, la réaction sera effectuée préférentiellement à des températures comprises entre -15 et 70°C.

l'invention a plus particulièrement pour objet un procédé de sulfatation du Dermatan Sulfate qui s'effectue à environ 0°C lorsqu'on désire obtenir les dérivés 6, O-sulfatés du dermatan Sulfate ou à environ 60°C lorsqu'on désire obtenir les dérivés persulfatés du Dermatan Sulfate. Ceci est illustré respectivement aux exemples 4 et 5.

Pour une chemiosélectivité optimale de la 6,6'-O sulfatation du Dermatan sulfate carboxy-réduit, sel de benzéthonium (Obtention des composés de formule (I) avec  $R_2=R_3=SO_3Na$  et  $R_4=H$  à partir des Composés de formule (I) avec  $R_2=R_3=R_4=H$ ), on opère préférentiellement en présence de 5 à 15 équivalents de complexe pyridine - anhydride sulfurique, à des températures comprises entre -15 et 5°C et en particulier à environ 0°C. Ceci est illustré à l'exemple 2.

Lors de la persulfatation du sel de benzéthonium du Dermatan carboxy-réduit (Obtention des composés de formule (I) avec  $R_2=R_3=R_4=SO_3Na$  à partir des composés de formule (I) avec  $R_2=R_3=R_4=H$ ), on opère de façon préférentielle entre 50 et 70°C. Ceci est illustré à l'exemple 3.

Par conséquent l'invention a également pour objet un procédé de sulfatation du Dermatan Sulfate carboxy-réduit qui s'effectue à environ 0°C lorsqu'on désire obtenir les composés 6,6' O-sulfatés tels que définis plus haut ( $R_2=R_3=SO_3Na$  et  $R_4=H$ ) ou à environ 60°C lorsqu'on désire obtenir les composés persulfatés tels que définis plus haut ( $R_2=R_3=R_4=SO_3Na$ ).

Lors de la deuxième sulfatation du dérivé persulfaté carboxy- réduit , sel de benzéthonium (Composés de formule (I) avec  $R_2=R_4=SO_3Na$  et  $R_3=H$ ), afin d'obtenir les composés de formule (I) avec ( $R_2=R_3=R_4=SO_3Na$ ) on opère préférentiellement en présence de 10 à 30 équivalents de complexe pyridine - anhydride sulfurique, à des températures voisines de 20°C. Ceci est illustré à l'exemple 6.

Par conséquent, l'invention a également pour objet le procédé tel que défini plus haut caractérisé en ce que la

sulfatation du Dermatan Sulfate carboxy-réduit trans-salifié sulfaté (Composés de formule (I) avec  $R_2=R_4=SO_3Na$  et  $R_3=H$ ) s'effectue à environ  $20^{\circ}C$  lorsqu'on désire obtenir les composés persulfatés (Composés de formule (I) avec  $R_2=R_3=R_4=SO_3Na$ ).

De même, Pour une chemiosélectivité optimale de la 6'-O sulfatation du Dermatan 6-O sulfaté carboxy-réduit, sel de benzéthonium (Composés de formule (I) avec  $R_2=SO_3Na$  et  $R_3=R_4=H$ ) afin d'obtenir les composés de formule (I) avec  $R_2=R_3=SO_3Na$  et  $R_4=H$ , on opère préférentiellement en présence de 5 à 15 équivalents de complexe pyridine - anhydride sulfurique, à des températures comprises entre  $-15$  et  $5^{\circ}C$ . Encore plus préférentiellement, on utilise environ 10 équivalents de complexe pyridine - anhydride sulfurique à une température voisine de  $-10^{\circ}C$ . Ceci est illustré à l'exemple 7.

L'invention a donc pour objet le Procédé tel que défini plus haut caractérisé en ce que la 6'-O sulfatation du Dermatan Sulfate carboxy-réduit trans-salifié 6,O-sulfaté (composés de formule (I) avec  $R_2=SO_3Na$  et  $R_3=R_4=H$ ) s'effectue à environ  $-10^{\circ}C$  lorsqu'on désire obtenir les composés 6,6'O-sulfatés (composés de formule (I) avec  $R_2=R_3=SO_3Na$  et  $R_4=H$ ).

La carboxy-réduction des dérivés du Dermatan Sulfate est réalisée en présence d'un dérivé carbodiimide. A titre d'exemple, on pourra utiliser le chlorhydrate de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide.

Par dérivés du Dermatan Sulfate, on entend les dérivés sulfatés du Dermatan sulfate, le sel de benzéthonium du Dermatan Sulfate, les dérivés persulfatés sels de benzethonium du Dermatan Sulfate ainsi que le Dermatan Sulfate sel de sodium.

La réduction proprement dite est réalisée avec un borohydrure de métal alcalin. A titre d'exemple, la réaction avec le dérivé carbodiimide est réalisée avec le borohydrure de sodium.

La réaction de formation de l'adduit avec le dérivé carbodiimide met préférentiellement en présence 5 à 20 équivalents de réactif et à un pH compris entre 4 et 5.

Encore plus préférentiellement, la réaction avec le dérivé carbodiimide est réalisée en présence de 7 à 13 équivalents de réactif et à un pH compris entre 4,3 et 4,9.

La réduction proprement dite de l'adduit activé des dérivés du Dermatan Sulfate est réalisée avec 10 à 300 équivalents de borohydrure de métal alcalin à une température comprise entre 10 et 70°C. Plus préférentiellement, la réduction de l'adduit sus mentionné est réalisée en présence de 140 à 250 équivalents de borohydrure de métal alcalin à une température comprise entre 10 et 30°C.

Selon un autre mode de la présente invention, la carboxy-réduction peut être réalisée par réduction d'un ester des dérivés du Dermatan Sulfate. A titre d'exemple, il est possible d'utiliser un dérivé ester méthylique.

On estérifie les dérivés du Dermatan Sulfate préalablement salifié sous forme de sel de benzéthonium, par les méthodes classiques d'estérification connues de l'homme du métier en mettant en œuvre un halogénure d'alkyle renfermant de 1 à 6 atomes de carbone tel que tel que l'iodure de méthyle ou un halogénure d'arylalkyle tel que le chlorure de benzyle en milieu organique. L'estérification proprement dite du Dermatan sulfate, sel de benzéthonium est réalisée en milieu organique en

présence par exemple d'iodure de méthyle. De façon préférentielle, l'estérification est réalisée dans le dichlorométhane en présence de 2 à 20 équivalents d'iodure de méthyle et à une température voisine de 20°C.

En particulier, l'estérification est réalisée dans le dichlorométhane en présence de 4 à 10 équivalents d'iodure de méthyle pendant environ 3 jours à une température voisine de 20°C.

De même, la réduction de l'ester méthylique du dérivé du Dermatan Sulfate sel de benzéthonium est réalisée avec 10 à 300 équivalents de borohydrure de métal alcalin à une température comprise entre 10 et 70°C. A titre d'exemple, la réduction de l'ester méthylique est réalisée avec le borohydrure de sodium.

Plus préférentiellement, la réduction de l'ester méthylique est réalisée en présence de 140 à 250 équivalents de borohydrure de métal alcalin à une température voisine de 20°C.

En particulier, l'invention a pour objet le procédé suivant :

- Trans-salification du Dermatan Sulfate par le chlorure de Benzéthonium
- Sulfatation du sel de benzéthonium du Dermatan Sulfate en milieu organique au moyen d'un complexe d'anhydride sulfurique avec une base organique telle que la pyridine ou la triméthylamine suivie d'une salification avec l'acétate de sodium.
- Soit Carboxy-réduction au moyen du chlorhydrate de 1-(3-diméthyl aminopropyl)-3-éthylcarbodiimide en présence du borohydrure de sodium,

- soit estérification par action du iodure de méthyle sur le dérivé Dermatan Sulfate préalablement trans-salifié par le chlorure de Benzéthonium puis réduction du dérivé ester méthylique par le borohydrure de sodium,
- puis le cas échéant trans-salification du dérivé persulfaté carboxy-réduit par le chlorure de Benzéthonium, puis resulfatation par le complexe d'anhydride sulfurique - pyridine suivies d'une salification par l'acétate de sodium.

De manière alternative, l'invention a également pour objet le procédé tel que défini précédemment mettant en oeuvre les étapes suivantes :

- soit Carboxy-réduction du Dermatan sulfate sel de sodium au moyen du chlorhydrate de 1-(3-diméthyl aminopropyl)-3-éthylcarbodiimide en présence de borohydrure de sodium,
- soit estérification par action du iodure de méthyle sur le dérivé Dermatan Sulfate préalablement trans-salifié par un sel d'ammonium quaternaire puis réduction du dérivé ester méthylique par le borohydrure de sodium, puis
- trans-salification du dérivé carboxy-réduit par le chlorure de Benzéthonium
- sulfatation par le complexe anhydride sulfurique - pyridine, suivie d'une salification par l'acétate de sodium.

Au cas où l'on désire obtenir des dérivés isolés à partir du mélange de dérivés carboxy-réduits du Dermatan Sulfate tels qu'obtenus selon le procédé décrit plus haut, le procédé suivant doit ensuite être appliqué au mélange :

- Fractionnement du mélange par chromatographie sur des colonnes remplies de gel de type polyacrylamide agarose

ou un gel de polyacrylamide. Le mélange est élué par une solution d'hydrogénocarbonate de sodium.

De préférence, la solution d'hydrogénocarbonate de sodium est une solution de 0,1 à 1 mole/l. Encore plus préférentiellement, la séparation est réalisée à une concentration de 1 mole/l. La détection est réalisée par réfractométrie.

L'invention a également pour objet les dérivés carboxy-réduits et chemiosélectivement O-sulfatés du Dermatan Sulfate, isolés ou en mélange tels que définis plus haut susceptibles d'être obtenus selon le ou les procédés tels que définis précédemment.

Les polysaccharides de formule (I), isolés ou en mélanges sont utilisables à titre de médicaments.

Ces polysaccharides présentent en particulier une forte activité inhibitrice de certaines métalloproteases de matrice. Ces inhibiteurs sont particulièrement indiqués pour le traitement d'états pathologiques où une forte augmentation de l'activité des métalloproteases de matrice est constatée.

Les états pathologiques auxquels la présente invention fait référence implique une augmentation de l'activité d'au moins une des métalloproteases de matrice suivante : la matrisilysine (MMP-7), la neutrophile elastase, l'aggrecanase, l'hADAMTS1 et la gélatinase A (MMP-2).

Les composés peuvent donc être utilisés, pour la prévention et le traitement de maladies telles que les désordres joint dégénératifs (tels que l'ostéoarthrose), les spondyloses, les chondrolyse associées avec les joint Trauma ou les immobilisations prolongées jointes



(souvent suite à une blessure du ménisque ou patellar ou les ruptures de ligaments), les désordres liés à des blessures (healing), les désordres periodontique, les désordres chronique du système locomoteur ( tels que arthritides chronique ou aiguës inflammatoires, immunologique ou du métabolisme), les arthropathies, myalgas ou les désordres liés au métabolisme osseux.

L'invention a également pour objet les compositions pharmaceutiques renfermant les composés de formule (I) isolés ou en mélange ainsi qu'un ou plusieurs excipients, véhicule ou additifs pharmaceutiquement acceptable.

Un autre aspect de l'invention est un procédé de préparation des compositions pharmaceutiques renfermant les composés de formule (I) caractérisés en ce qu'on mélange une quantité correspondant à un dosage désiré d'un composé de formule (I) avec un ou plusieurs excipients, véhicule ou additifs pharmaceutiquement acceptable.

Les composés de formule (I) peuvent être administrés par différente voie. Elles peuvent inclure sans être limité aux injections par voie subcutanée, intraarticulaire, intrapéritonée ou intraveineuse.

L'administration peut également être rectale, orale, par inhalation, ou encore par voie transdermique.

Dans le cas de solutions pour injection (par exemple sous forme d'ampoule), les doses peuvent s'échelonner de 5  $\mu$ g à environ 200 mg de composé de formule (I) et de préférence de 10  $\mu$ g à 40 mg.

Le dosage quotidien indiqué pour le traitement d'un patient adulte d'environ 70 Kg est de 10  $\mu$ g à 500 mg d'ingrédients actifs généralement de 20 mg à environ 100

mg. Cependant selon les circonstances des doses quotidiennes plus hautes ou plus basses peuvent être appropriées.

Ces doses peuvent être administrées une fois par jour sous la forme d'une seule unité de dosage.

Alternativement, les doses peuvent être administrées dans une pluralité de doses plus petites données de manière répétées à des intervalles définis au cours du temps.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois la limiter.

#### **Dermatan Sulfate**

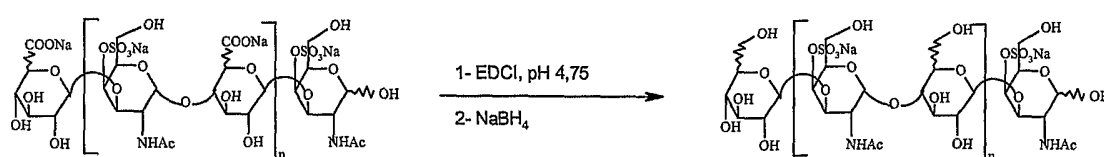
Le Dermatan Sulfate utilisé pour la préparation des composés illustrant cette invention présente une masse moléculaire de 30 à 40 K Daltons. Il est isolé lors de la préparation d'héparine de mucus de porc. A partir des eaux-mères de précipitation de l'héparine brute, on peut isoler un mélange d'héparinoides / dermatan sulfate. Pour obtenir du dermatan sulfate pur, on peut par exemple utiliser les conditions suivantes :

On prépare une solution de 13 g de mélange héparinoides / Dermatan (contenant environ 50 % de Dermatan) dans 130 ml d'eau. Le pH est ensuite ajusté à pH 3 avec de l'acide acétique concentré puis on ajoute 0,9g de nitrite de sodium à une température voisine de 20°C. Après 18 heures d'agitation, le milieu réactionnel est refroidi à une température voisine de 0°C, puis neutralisé à pH 7 avec de la soude concentrée (7,5 N). On ajuste le milieu réactionnel à une teneur de 10% en chlorure de sodium puis on ajoute un volume de méthanol (soit environ 130 ml). Le précipité obtenu est filtré, lavé par 5 ml de

méthanol, puis séché pour fournir 4,8 g d'un solide blanc cassé. Le rendement obtenu est de 73 %.

**Exemple 1 : Préparation du Dermatan Sulfate carboxy-réduit, sel de sodium**

(Composés de formule (I) avec les groupements  $R_2 = R_3 = R_4 = H$ )

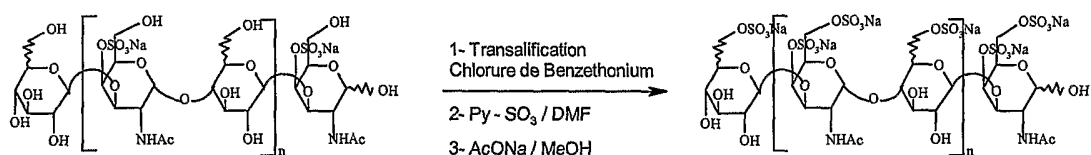


A une température voisine de 20°C, on prépare une solution de 1 g de Dermatan Sulfate, sel de sodium dans 150 ml d'eau. Le pH est ajusté à pH 4,7  $\pm$  0,1 avec une solution d'acide chlorhydrique 0,1N. On ajoute 3,6 g de chlorhydrate de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide puis on agite en maintenant le pH à 4,7  $\pm$  0,1. Lorsque le pH n'évolue plus, on ajoute alors par petites portions 14,7g de borohydrure de sodium. Le milieu réactionnel est agité environ 20 heures à une température voisine de 20°C. Après refroidissement à une température voisine de 15°C, le milieu réactionnel est neutralisé par de l'acide chlorhydrique concentré à un pH voisin de 7. Le milieu réactionnel est chargé dans une membrane en ester de cellulose PM 1000 et mis en dialyse en changeant les bains d'eau régulièrement pendant environ 48 heures (le quatrième bain est réalisé avec une solution de chlorure de sodium 2N. Les trois derniers bains sont réalisées à l'eau desionisée). Le contenu des membranes est lyophilisé. On obtient 0,8 g d'un lyophilisat blanc. Le rendement obtenu est de 92 %.

Spectre proton dans D<sub>2</sub>O, 400MHz, T=323 K ( $\delta$  en ppm - Mélange des épimérisés en C5) : 2,0 (3H, s), 3,5 (1H, m), 3,6 (2H, s), entre 3,67 et 3,8 (5H, m), 3,94 (1H, t, J=6Hz), 3,98 (1H, d, J=6Hz), 4,32 (1H, s), 4,54 (1H, d, J=5Hz), 4,7 (1H, s), 4,76 (1H, s).

**EXEMPLE 2 : Préparation du Dermatan Sulfate carboxy-réduit 6,6'-O sulfaté, sel de sodium**

(Composés de formule (I) avec les groupements R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = SO<sub>3</sub>Na et R<sub>4</sub> = H)



**- a) Préparation du dermatan sulfate carboxy-réduit, sel de sodium**

Le Dermatan Sulfate carboxy-réduit, sel de sodium est préparé selon l'exemple 1.

**- b) Préparation du dermatan sulfate carboxy-réduit, sel de benzéthonium**

A une solution de 0,4 g de Dermatan Sulfate carboxy-réduit, sel de sodium dans 6 ml d'eau, on ajoute une solution de 1 g de chlorure de benzéthonium dans 7 ml d'eau. La suspension blanche est filtrée. Le gâteau est lavé avec 3 portions de 15 ml d'eau, puis séché à environ 40°C sous pression réduite (6 kPa). On obtient 0,73 g d'un solide jaunâtre translucide. Le rendement obtenu est quantitatif.

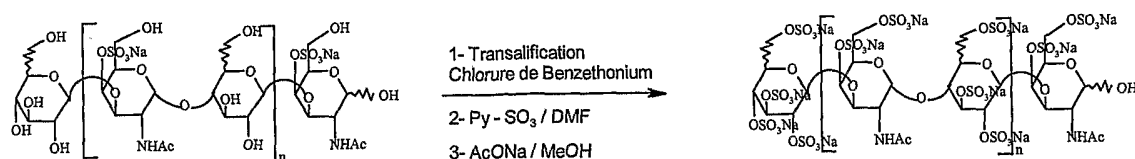
**- c) Préparation Dermatan Sulfate carboxy-réduit 6,6'-O sulfaté, sel de sodium**

A une température voisine de 20°C et sous atmosphère inerte, on dissout 0,73 g de Dermatan Sulfate carboxy-réduit, sel de benzéthonium dans 20 ml de diméthylformamide anhydre. La solution obtenue est refroidie à environ 0°C puis on coule une solution de 1,23 g de complexe pyridine - anhydride sulfurique dans 10 ml de diméthylformamide anhydre. Après 1 heure 30 d'agitation à une température voisine de 0°C, on ajoute 15 ml d'eau au milieu réactionnel. On coule ensuite 150 ml d'une solution méthanolique à 10 % d'acétate de sodium. La suspension obtenue est filtrée puis le gâteau est lavé avec 10 ml de méthanol. Le solide obtenu est dissous dans 50 ml d'eau puis re-précipité avec 150 ml d'une solution méthanolique à 10 % d'acétate de sodium. La suspension est filtrée puis le gâteau est lavé avec 10 ml de méthanol. Le solide blanc obtenu est dissous dans 10 ml d'eau puis la solution est chargée dans une membrane en ester de cellulose PM 3500 et mise en dialyse en changeant les bains d'eau régulièrement pendant 72 heures. Le contenu des membranes est lyophilisé. On obtient 55 mg d'un lyophilisat blanc. Le rendement obtenu est de 10 %.

Spectre proton dans D<sub>2</sub>O, 400MHz, T=333 K,  $\delta$  en ppm: 2,0 (3H, s), 3,49 (1H, m), 3,8 (1H, m), entre 3,9 et 4,25 (8H, m), 4,45 (1H, m), 4,57 (1H, s large), 4,75 (1H, s), 4, 4,80 (1H, s).

**EXEMPLE 3 : Préparation du Dermatan Sulfate carboxy-réduit et persulfaté, sel de sodium**

(Composés de formule (I) avec les groupements  $R_2 = R_3 = R_4 = SO_3Na$ )



**- a) Préparation du Dermatan Sulfate carboxy-réduit, sel de sodium**

Le dermatan sulfate carboxy-réduit, sel de sodium est préparé selon l'exemple 1.

**- b) Préparation du Dermatan Sulfate carboxy-réduit, sel de benzéthonium**

Le Dermatan Sulfate carboxy-réduit, sel de benzéthonium est préparé selon l'exemple 2b.

**- c) Préparation du Dermatan Sulfate carboxy-réduit et persulfaté, sel de sodium**

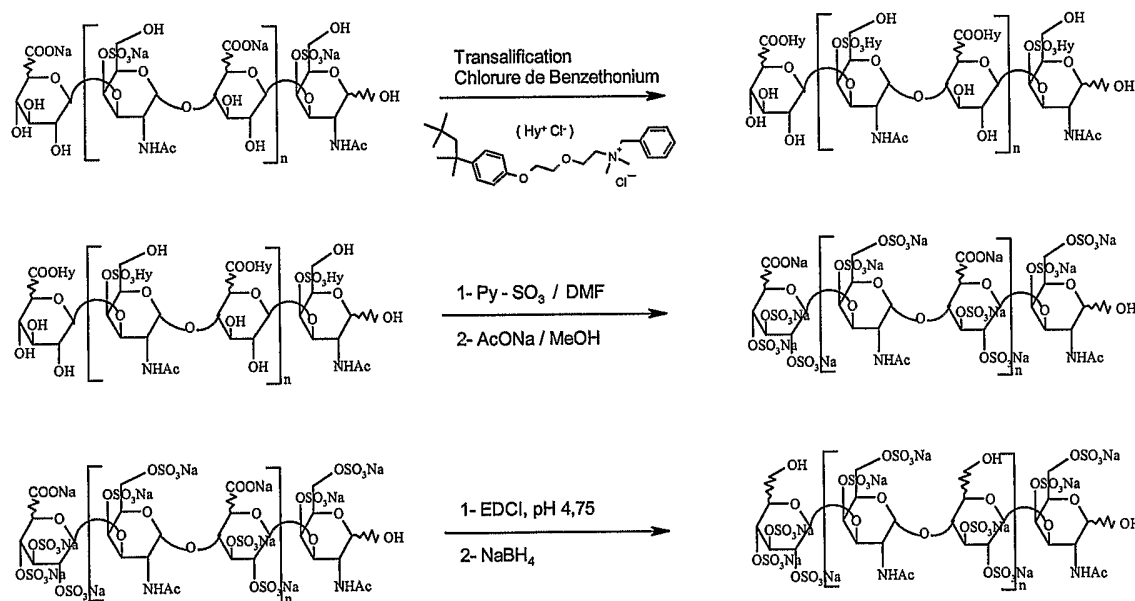
A une température voisine de 60°C et sous atmosphère inerte, on dissout 0,24 g de Dermatan Sulfate carboxy-réduit, sel de benzéthonium dans 5 ml de diméthylformamide anhydre. Lorsque la dissolution est complète, on coule une solution de 2,94 g de complexe pyridine - anhydride sulfurique dans 12 ml de diméthylformamide anhydre. Le mélange est agité 2 heures 30 à une température voisine de 60°C, puis refroidit à une température voisine de 10 °C. On ajoute 6 ml d'eau au milieu réactionnel, puis 60 ml d'une solution méthanolique à 10 % d'acétate de sodium. La suspension obtenue est laissée à sédimenter une nuit, puis filtrée. Le gâteau est dissous dans 20 ml d'eau puis re-précipité avec 60 ml d'une solution méthanolique à 10 % d'acétate de sodium. La suspension est filtrée. Le gâteau est dissous de nouveau dans 50 ml d'eau puis la solution est chargée dans une membrane en ester de cellulose PM 3500 et mise en dialyse en changeant les bains d'eau

régulièrement pendant 72 heures. Le contenu des membranes est lyophilisé. On obtient 83 mg d'un lyophilisat blanc. Le rendement obtenu est de 30 %.

Spectre proton dans D<sub>2</sub>O, 400MHz, T=313 K,  $\delta$  en ppm : 2,0 (3H, s), entre 3,8 et 3,98 (4H, m), 4,03 (2H, m), 4,13 (1H, m), 4,18 (1H, m), 4,3 (1H, m), 4,6 (1H, s large), 4,68 (1H, m), 4,8 (2H, m), 5,04 (1H, s).

**EXEMPLE 4 : Préparation du Dermatan Sulfate persulfaté carboxy-réduit, sel de sodium**

(Composés de formule (I) avec les groupements  $R_2 = R_4 = \text{SO}_3\text{Na}$  et  $R_3 = \text{H}$ )



**- a) Préparation du Dermatan Sulfate, sel de benzéthonium**

A une solution de 5 g de dermatan sulfate, sel de sodium dans 75 ml d'eau, on ajoute une solution de 11,6 g de chlorure de benzéthonium dans 85 ml d'eau. La suspension blanche est filtrée. Le gâteau est lavé avec 6 portions de 150 ml d'eau, puis séché à 60°C sous pression réduite

(6 kPa) pendant environ 72 h. On obtient 12 g d'un solide crème. Le rendement obtenu est de 94 %.

**- b) Préparation du Dermatan Sulfate persulfaté, sel de sodium**

A une température voisine de 60°C et sous atmosphère inerte, on dissout 4 g de Dermatan Sulfate, sel de benzéthonium dans 80 ml de diméthylformamide anhydre. Après dissolution, on coule en environ 45 minutes une solution de 22,35 g de complexe pyridine - anhydride sulfurique dans 200 ml de diméthylformamide anhydre. Après 1 heure 30 d'agitation, le milieu réactionnel est refroidi à une température voisine de 15°C puis on ajoute 50 ml d'eau. L'addition terminée, on ajoute 990 ml d'une solution méthanolique à 10 % d'acétate de sodium. La suspension est filtrée. Le solide obtenu est dissout dans 200 ml d'eau puis re-précipité avec 600 ml d'une solution méthanolique à 10 % d'acétate de sodium. La suspension est filtrée puis le solide blanc obtenu est dissout dans 200 ml d'eau. La solution obtenue est chargée dans une membrane en ester de cellulose PM 1000 et mise en dialyse en changeant les bains d'eau régulièrement pendant 48 heures. Le contenu des membranes est lyophilisé. On obtient 1,31 g d'un lyophilisat blanc. Le rendement obtenu est de 51,8 %.

Spectre proton dans D<sub>2</sub>O, 400MHz, T=303 K,  $\delta$  en ppm : 2,02 (3H, s), 3,98 (3H, m), 4,21 (3H, m), 4,3 (1H, m), 4,67 (1H, m), 4,81 (1H, s), 4,9 (2H, m), 5,15 (1H, s).

**- c) Préparation du dermatan sulfate persulfaté carboxy-réduit, sel de sodium**

A une température voisine de 20°C, on prépare une solution de 1,22g de dermatan persulfaté sel de sodium

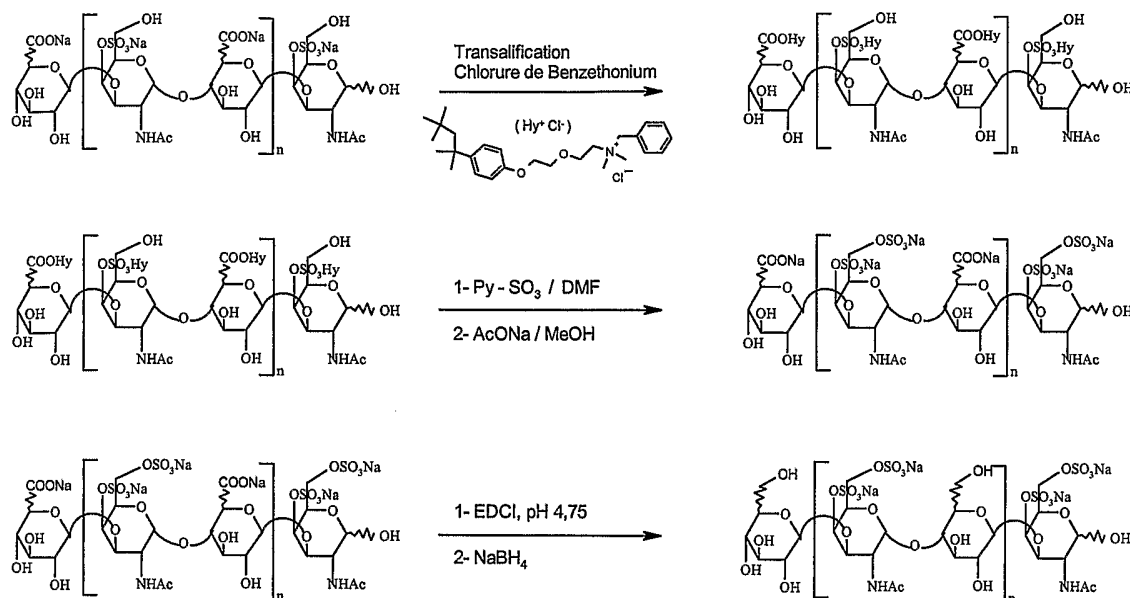


dans 190 ml d'eau. Le pH est ajusté à  $\text{pH } 4,7 \pm 0,1$  avec une solution d'acide chlorhydrique 0,1N. On ajoute 2,72 g de chlorhydrate de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide puis on agite en maintenant le pH à  $4,7 \pm 0,1$ . Lorsque le pH n'évolue plus, on ajoute alors par petites portions 11,1 g de borohydrure de sodium. Le milieu réactionnel est agité environ 20 heures à une température voisine de 20°C. Après refroidissement à une température voisine 4°C, le milieu réactionnel est neutralisé à pH 7 avec de l'acide chlorhydrique concentré (10 N). La suspension blanche est chargée dans une membrane en ester de cellulose PM 1000 et mise en dialyse en changeant les bains d'eau régulièrement pendant 20 heures. On ajoute au contenu des membranes (400 ml) 1,2 l d'une solution méthanolique à 10 % d'acétate de sodium. La suspension est filtrée puis le gâteau est lavé avec 3 portions de 100 ml de méthanol. Le solide blanc obtenu est dissous dans l'eau. La solution obtenue est chargée dans une membrane en ester de cellulose PM 1000 et mise en dialyse en changeant les bains d'eau régulièrement pendant 72 heures. Le contenu des membranes est lyophilisé. On obtient 0,464 g d'un lyophilisat blanc. Le rendement obtenu est de 39 %.

Spectre proton dans  $\text{D}_2\text{O}$ , 400MHz,  $T=333 \text{ K}$ ,  $\delta$  en ppm : 2,0 (3H, s), 3,59 (2H, d,  $J=4\text{Hz}$ ), 3,8 (1H, s), entre 3,85 et 4,02 (3H, m), 4,18 (2H, m), 4,27 (1H, m), 4,55 (1H, s), 4,65 (1H, s large), 4,8 (1H, s), 4,88 (1H, s), 5,05 (1H, s).

**EXEMPLE 5 : Préparation du Dermatan Sulfate 6-O sulfaté carboxy-réduit, sel de sodium**

(Composés de formule (I) avec les groupements  $R_2 = SO_3Na$  et  $R_3 = R_4 = H$ )



**- a) Préparation du Dermatan Sulfate, sel de benzéthonium**

Le sel de benzéthonium du dermatan sulfate utilisé dans cet exemple est commun à celui de l'exemple 4 a).

**- b) Préparation du Dermatan Sulfate 6-O sulfaté, sel de sodium**

A une température voisine de 20°C et sous atmosphère inerte, on dissout 4 g de dermatan sulfate, sel de benzéthonium dans 80 ml de diméthylformamide anhydre. Après dissolution, on refroidit à une température voisine de 0°C et on ajoute une solution de 4,4 g de complexe pyridine - anhydride sulfurique dans 40 ml de diméthylformamide anhydre. Après 2 heures 30 d'agitation à une température voisine de 0°C, on ajoute au milieu réactionnel 60 ml d'eau. L'addition terminée, on ajoute 600 ml d'une solution méthanolique à 10 % d'acétate de sodium. La suspension est filtrée et le gâteau est lavé avec 30 ml de méthanol. Le solide obtenu est dissous dans

200 ml d'eau puis est précipité avec 600 ml d'une solution méthanolique à 10 % d'acétate de sodium. Après environ 16 h de sédimentation, le mélange est filtré et le gâteau est lavé avec 20 ml de méthanol. Le solide blanc obtenu est dissous dans 150 ml d'eau. La solution obtenue est chargée dans une membrane en ester de cellulose PM 1000 et mise en dialyse en changeant les bains d'eau régulièrement pendant 24 heures. La solution dialysée est ensuite lyophilisée. On obtient 0,9 g d'un lyophilisat blanc. Le rendement obtenu est de 47 %.

Spectre proton dans D<sub>2</sub>O, 400MHz, T=328 K,  $\delta$  en ppm : 2,0 (3H, s), 3,48 (1H, m), entre 3,85 et 4,1 (5H, m), 4,18 (2H, m), 4,65 (3H, m), 4,8 (1H, s).

**- c) Préparation du Dermatan Sulfate 6-O sulfaté carboxy-réduit, sel de sodium**

A une température voisine de 20°C, on prépare une solution de 0,8 g de dermatan sulfate 6-O sulfaté, sel de sodium dans 75 ml d'eau. Le pH est ajusté à pH 4,7  $\pm$  0,1 avec une solution d'acide chlorhydrique 0,1 N. On ajoute 2,4 g de chlorhydrate de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide puis on agite en maintenant le pH à 4,7  $\pm$  0,1.

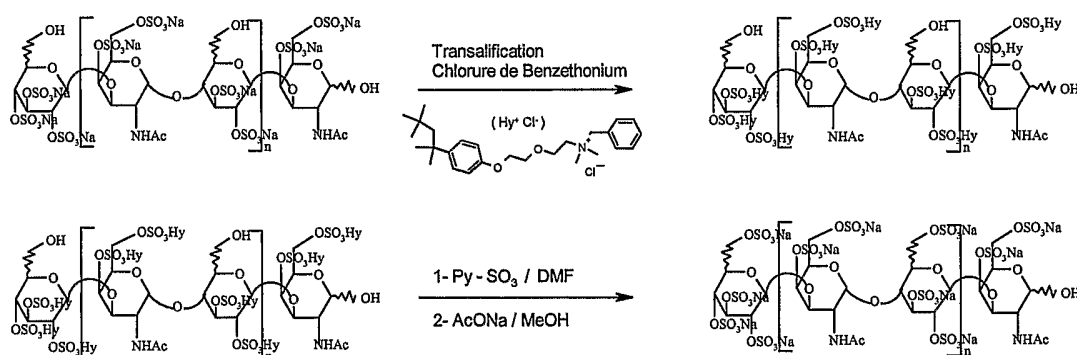
Lorsque le pH n'évolue plus, on ajoute par petites portions 9,7 g de borohydrure de sodium. Le milieu réactionnel est agité environ 20 heures à une température voisine de 20°C. Après refroidissement à une température voisine de 15°C, le milieu réactionnel est neutralisé à pH 7 avec de l'acide chlorhydrique concentré (10 N). Le mélange réactionnel est chargé dans une membrane en ester de cellulose PM 1000 et mis en dialyse en changeant les bains d'eau régulièrement pendant 24 heures. On ajoute au

contenu des membranes (300 ml) 900 ml d'une solution méthanolique à 10 % d'acétate de sodium. La suspension est filtrée et le gâteau est dissous dans 50 ml d'eau. La solution ainsi préparée est chargée dans une membrane en ester de cellulose PM 1000 et mise en dialyse en changeant les bains d'eau régulièrement pendant 50 heures. Le contenu des membranes est ensuite lyophilisé. On obtient 0,54 g d'un lyophilisat blanc. Le rendement obtenu est de 72 %.

Spectre proton dans D<sub>2</sub>O, 400MHz, T=328 K,  $\delta$  en ppm : 2,0 (3H, s), 3,5 (1H, m), 3,55 (2H, s), 3,7 (1H, s), 3,76 (1H, s), entre 3,87 et 4,05 (3H, m), entre 4,07 et 4,21 (2H, m), 4,3 (1H, m), 4,55 (1H, s large), 4,72 (2H, m).

**EXEMPLE 6 : Préparation du Dermatan Sulfate carboxy-réduit et persulfaté, sel de sodium**

(Composés de formule (I) avec les groupements  $R_2 = R_3 = R_4 = \text{SO}_3\text{Na}$ )



Le dérivé du Dermatan illustrant cet exemple peut être préparé à partir du Dermatan Sulfate persulfaté carboxy réduit, sel de sodium issu de l'exemple 4.

**- a) Préparation du Dermatan Sulfate persulfaté carboxy-réduit, sel de benzéthonium.**

A une solution de 0,28 g de dermatan sulfate persulfaté carboxy-réduit, sel de sodium dans 10 ml d'eau, on ajoute

une solution de 0,65 g de chlorure de benzéthonium dans 10 ml d'eau. La suspension blanche est filtrée. Le gâteau est lavé avec 5 portions de 40 ml d'eau, puis séché à 60°C sous pression réduite (6 kPa) pendant environ 48 heures. On obtient 0,685 g d'un solide crème. Le rendement obtenu est de 81 %.

**b) Préparation du dermatan sulfate carboxy-réduit et persulfaté, sel de sodium**

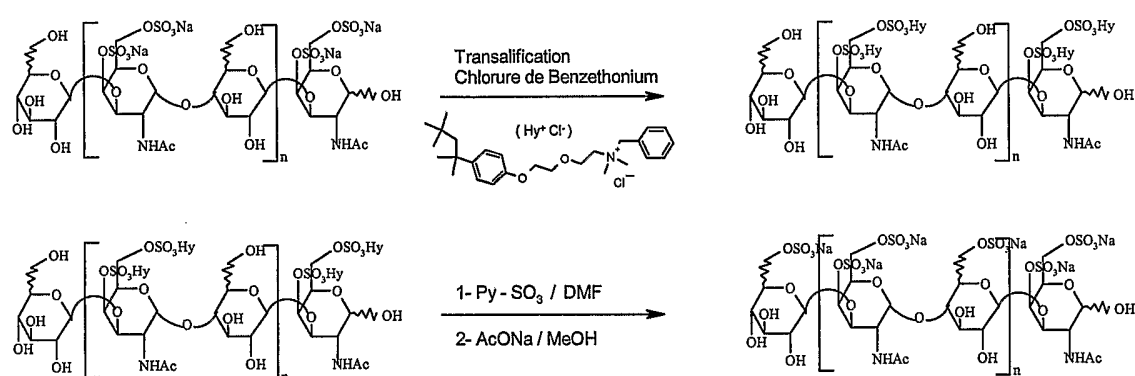
A une température voisine de 20°C et sous atmosphère inerte, on dissout 0,685 g de dermatan sulfate persulfaté carboxy-réduit, sel de benzéthonium dans 8 ml de diméthylformamide anhydre. Après dissolution, on ajoute une solution de 0,936 g de complexe pyridine - anhydride sulfurique dans 4 ml de diméthylformamide anhydre. Après 2 heures 30 d'agitation à une température voisine de 20°C, le milieu réactionnel est refroidi à une température voisine de 10°C puis on ajoute 6 ml d'eau. L'addition terminée, on ajoute 120 ml d'une solution à 10% d'acétate de sodium dans le méthanol. La suspension est filtrée et le gâteau est lavé avec 5 ml de méthanol. Le solide obtenu est dissous dans 40 ml d'eau puis est précipité avec 120 ml d'une solution méthanolique à 10 % d'acétate de sodium. La suspension est filtrée et le solide blanc obtenu est dissous dans 20 ml d'eau. La solution obtenue est filtrée sur membrane 0,2  $\mu$ m puis chargée dans une membrane en ester de cellulose PM 1000 et mise en dialyse en changeant les bains d'eau régulièrement pendant 24 heures. Le contenu des membranes est lyophilisé. On obtient 0,128 g d'un lyophilisat blanc. Le rendement obtenu est de 50 %.

Spectre proton dans D<sub>2</sub>O, 400MHz, T=313 K,  $\delta$  en ppm : 2,0 (3H, s), entre 3,8 et 3,98 (4H, m), 4,03 (2H, m), 4,13

(1H, m), 4,18 (1H, m), 4,3 (1H, m), 4,6 (1H, s large), 4,68 (1H, m), 4,8 (2H, m), 5,04 (1H, s).

**EXEMPLE 7 : Préparation du Dermatan Sulfate carboxy réduit 6,6'-O sulfaté, sel de sodium**

(Composés de formule (I) avec les groupements  $R_2 = R_3 = \text{SO}_3\text{Na}$  et  $R_4 = \text{H}$ )



Le dermatan sulfate carboxy-réduit 6-O sulfaté, sel de sodium utilisé pour cette préparation est issu de l'exemple 5.

**- a) Préparation du dermatan sulfate carboxy-réduit 6-O sulfaté, sel de benzéthonium**

A une solution de 0,35 g de dermatan sulfate carboxy-réduit 6-O sulfaté, sel de sodium dans 10 ml d'eau, on ajoute une solution de 0,552 g de chlorure de benzéthonium dans 10 ml d'eau. La suspension blanche est filtrée. Le gâteau est lavé avec 6 portions de 10 ml d'eau, puis séché à température ambiante sous pression réduite (6 kPa) et sur potasse pendant environ 48 heures. On obtient 0,7 g d'un solide crème. Le rendement obtenu est de 84 %.

**b) Préparation du dermatan sulfate carboxy-réduit 6, 6'-O sulfaté, sel de sodium**

A une température voisine de 20°C et sous atmosphère inerte, on dissout 0,7 g de dermatan sulfate 6-O sulfaté carboxy-réduit, sel de benzéthonium dans 11 ml de diméthylformamide anhydre. Après dissolution, on ajoute une solution de 0,745 g de complexe pyridine - anhydride sulfurique dans 5,5 ml de diméthylformamide anhydre, à une température voisine de -10°C. Le milieu réactionnel est agité 2 heures 30 à une température voisine de -10°C. On ajoute 7 ml d'eau. L'addition terminée, on ajoute 90 ml d'une solution à 10 % d'acétate de sodium dans le méthanol. La suspension est filtrée et le gâteau est lavé avec 10 ml de méthanol. Le solide obtenu est dissous dans 30 ml d'eau puis est précipité avec 90 ml d'une solution méthanolique à 10 % d'acétate de sodium. La suspension est filtrée et le solide blanc obtenu est lavé par 5 ml de méthanol, puis dissous dans 10 ml d'eau. La solution obtenue est chargée dans une membrane en ester de cellulose PM 3500 et mise en dialyse en changeant les bains d'eau régulièrement pendant 24 heures. Le contenu des membranes est lyophilisé. On obtient 0,252g d'un lyophilisat blanc. Le rendement obtenu est de 72 %.

Spectre proton dans D<sub>2</sub>O, 400MHz, T=323 K,  $\delta$  en ppm : 2,0 (3H, s), 3,49 (1H, m), 3,8 (1H, m), entre 3,9 et 4,25 (8H, m), 4,45 (1H, m), 4,57 (1H, s large), 4,75 (1H, s), 4, 4,80 (1H, s).

#### Test pharmacologique

**Effet des dérivés carboxy-réduits selon l'invention sur l'Aggrecanase des fluides synoviaux ou sur des préparations de protéine recombinante ADAMTS.**

L'analyse est effectuée sur des plaques 96-puits. Avant l'analyse, des dilutions sérielles des composés de l'essai sont préparées dans une solution aqueuse

Digestion:

Dans chaque puits, un volume fixe de fluide synovial ou d'activité aggrécanase générant une augmentation connue, entre 1,0 et 1,4 unités d'absorbance (405 nm) dans les conditions de l'analyse est mélangé avec 3 µl de solution de composé de l'étape de dilution respective. Le milieu d'Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) est ajouté à chaque puits pour fournir un volume final de 300 µl. Ensuite, la plaque est incubée 1 heure à 37°C dans une atmosphère de dioxyde de carbone.

Après un ajout de 5 µl d'une solution de 1 µg/µl de substrat recombinant Agg1mut dans le DMEM à chaque puits (substrat tel que décrit par Bartnik E. et al., EP 785274, 1997), le mélange réactif est incubé pendant 4 heures à 37°C sous atmosphère de dioxyde de carbone.

Préparation de la plaque d'analyse :

Lors d'une première étape, la microplaque est enduite au moyen de 100 µl par puits d'un anticorps anti-souris de chèvre IgG du commerce pendant 1 heure à température ambiante (5 µg/ml dans une solution saline de phosphate tamponnée pH 7,4 [Tampon PBS]). Après lavage avec le tampon PBS contenant 0,1 % de Tween-20 (tampon de lavage), les puits sont bloqués par une étape d'une heure d'incubation au moyen de 100 µl par puits de 5 % de sérum d'albumine bovin dans un tampon PBS contenant 0,05 % de Tween-20. A la suite d'un autre rinçage au moyen du tampon de lavage, chaque puits est incubé avec 100 µl d'une solution diluée à 1:1000 d'anticorps BC-3 dans un tampon PBS contenant 0,05 % de Tween 20 et 0,5 % d'albumine de sérum bovin à température ambiante pendant une heure. Cet anticorps reconnaît les fragments de clivage typiques de l'aggrécanase (Hughes C.E. et al., Biochem. J. 305 (3), 799-804, 1995).

Mode Opératoire du test:



Après un autre rinçage de la plaque d'analyse avec le tampon de lavage, le jeu complet des mélanges provenant de la digestion précédente est transféré puits par puits vers cette plaque et incubé à température ambiante pendant une heure. La plaque est à nouveau lavée tel que ci-dessus. Ensuite, 100 µl du second anticorps (anticorps anti-humain IgG, marqué à la peroxydase, 1:1000 dans du PBS contenant 0,5 % de ASB et 0,05 % de Tween-20) sont ajoutés à chaque puits, avec une incubation ultérieure à température ambiante pendant à nouveau une heure. A la suite d'un rinçage final avec le tampon de lavage, le développement de la couleur est initié par ajout de 100 µl de solution de substrat ABTS (2mg/ml, 2,2'-azinobis (3 ethylbenzthiazoline sulfonic acid dans 40 mM de citrate de sodium plus 60 mM d'hydrogenophosphate disodique, ajusté à un pH 4,4 par ajout d'acide acétique ; 0,25 µl de peroxyde d'hydrogène à 35 % ajouté par ml immédiatement avant la mesure). La mesure est effectuée au moyen du mode de tamis à l'aide d'une détection à 405 nm par rapport à un filtre de référence (620 nm) avec des lectures automatiques à des intervalles de 5 secondes. Le développement est arrêté dès que le signal maximum (405 nm) dans la gamme d'absorbance de 1,0 à 1,4 est atteint.

Tableau 1

Conc. de glycosaminoglycan (µg/ml)	% Conversion			
	Exemple 3 ou 6	Exemple 2 ou 7	Exemple 4	Exemple 5
1,0				36,1
0,1	20,2	43,9	18,0	70,2
0,01	19,2	65,8	27,4	84,3

0,001	59,0	87,7	93,4	96,4
0,0001	96,7	96,5	100,0	100,0
IC <sub>50</sub> estimée (µg/ml) :	0.0016	0,003	0,007	0,26

L' IC<sub>50</sub> estimée du produit de l'exemple 1 (dérivé uniquement carboxy-réduit) est de l'ordre de 7.9 µg/ml

**Effet du dérivé persulfaté carboxy-réduit (exemple 3) sur l'aggrécanase de chondrocytes bovins cultivés dans des billes d'Alginate**

Afin de générer une activité de l'aggrécanase, les chondrocytes bovins mis en culture dans des gels de matrice d'alginate sont stimulés avec 10 ng/ml de IL-1 $\alpha$  pendant 3 jours conformément au procédé de Hughes C.E. et al., J. Biol. Chem. 273, 30576-30582, 1998.

Dans chaque puits d'une plaque de culture cellulaire 96 puits, 200 µl de surnageant chondrocyte contenant une activité de l'aggrécanase sont mélangés avec 100 µl de milieu de culture cellulaire DMEM. Aux concentrations à tester, 5 µl d'une solution aqueuse du produit de l'exemple 2 est ajouté pour inhiber l'activité de l'aggrécanase, une heure avant l'ajout de 5 µg de substrat recombinant Agglmut (Bartnik E. et al., EP 785274, 1997). Le mélange est incubé à 37°C pendant 17 heures et ensuite transféré dans une plaque ELISA afin de détecter les néoépitopes générés par l'activité de l'aggrécanase en liant de l'anticorps BC-3 tel que décrit auparavant (Hughes C.E. et al., Biochem. J. 305 (3), 799-804, 1995).

**Tableau 2**

(% d'inhibition de la conversion du substrat par activité de l'aggrécanase dans le surnageant)

Concentration du produit de l'exemple 3 ( $\mu\text{g/ml}$ )	% Inhibition
100	73,8
10	60,2
1	12,9
0,1	9,8
0,01	5,1

**IC<sub>50</sub> : 0,0059 mg/ml**

#### **Inhibition du facteur Xa**

Pour la calibration, un échantillon standard d'héparine de bas poids moléculaire (Enoxaparin) a été utilisé comme référence

Les dilutions sérielles du composé de l'essai sont préparées dans un tampon de 0,046 M Tris pH 8,4 contenant 0,15 M NaCl, 0,007 M EDTA, 0,1% de Tween 80 et 0,12 IU/ml d'antithrombine humaine III. Les échantillons de 50  $\mu\text{l}$  des dilutions respectives sont incubés avec 50  $\mu\text{l}$  de facteur bovin Xa (13,6 U/ml) à 37°C pendant 80 secondes. Ensuite, 50  $\mu\text{l}$  de substrat chromogénique 1,1 mM S-2765 sont ajoutés. L'absorbance à 405 nm est mesurée dans un photomètre. L'activité du facteur débloqué Xa est indiquée par l'émission de p-nitroaniline à partir du substrat.

Lorsque comparés au composé d'héparine de bas poids moléculaire de référence (100 U/mg), les glycosamoglycane présentent un facteur Xa d'activité inhibitrice bien inférieur :

Composé testé	Activité anti facteur Xa (U/mg)
Exemples 3, 6	2,6
Exemples 2, 7	0,6
Exemple 4	1,1
Exemple 5	0

**Effet du dérivé persulfaté carboxy-réduit (exemple 3) des métalloproteases humaines MMP-2 (gelatinase-A) et MMP7**

Des Kit ELISA commerciaux (comme ceux fournis par exemple par la société Amersham Biosciences, kits RPN2617 and RPN 2620) ont été respectivement utilisés pour la détermination de l'activité inhibitrice des enzymes MMP-2 et MMP-7. Les concentrations des enzymes sont respectivement de 800 ng/ml pour MMP-2 et 300 ng/ml pour MMP-7. Les tests ont été réalisés en accord avec les recommandations du fabricant en réalisant une série de dilutions du composé à étudier dans un tampon PBS pH 7.5. Les enzymes MMP-2 et MMP-7 ont été toutes deux inhibées de façon concentration -dépendante.

Dérivé obtenu selon l'exemple 3

IC<sub>50</sub> :        0.6 µg/ml (effect on MMP-2)  
                   0.04 µg/ml (effect on MMP-7)

**Effets des dérivés carboxy-réduits selon l'invention sur l'Elastase de Neutrophiles humains**

Une enzyme disponible dans le commerce (par exemple, de l'élastase neutrophile humaine, Sigma n° E8140) est reconstituée en aliquots de 0,1 mg par fiole à l'aide de 0,276 ml de tampon d'acétate de sodium à 50 mM pH 5,5 contenant 200 mM NaCl (solution mère de l'enzyme); 11 µl

de cette solution mère sont dilués avec 1,1 ml du tampon HEPES ci-dessus (solution d'essai de l'enzyme).

La solution de substrat est préparée en dissolvant 118 mg de Methoxy-succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Val-p-nitroanilide dans 1 ml de DMSO (solution mère, par exemple, Sigma n° M4765). En vue de l'application dans l'analyse, 9 µl de solution mère sont ensuite dilués dans 1,19 ml d'H<sub>2</sub>O.

Les dilutions sérielles des composés de l'essai sont préparées dans 100 mM de tampon HEPES contenant 500 mM NaCl. L'analyse est effectuée sur des microplaques en polystyrène 96 puits incolores (par exemple, Corning Costar, n° 3695).

10 µl de solution d'enzyme d'essai sont mélangés avec 10 µl de la solution respective de composé dilué et 10 µl de la solution de substrat. Au bout de 15 min d'incubation, le clivage du substrat est lu en tant qu'augmentation de l'absorbance à 405 nm

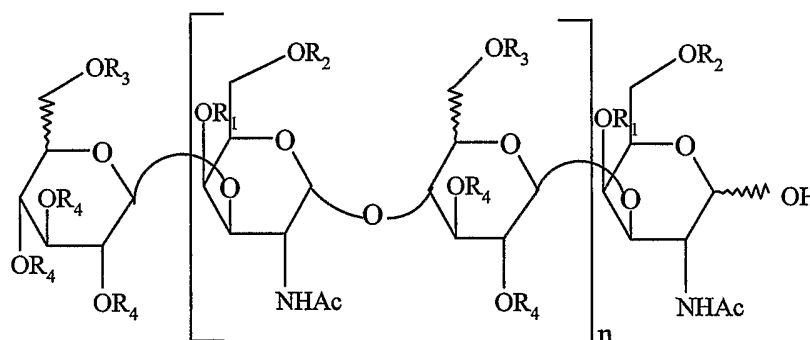
Tableau 4 Activité d'inhibition de l'elastase de neutrophile humain

Composé testé	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Exemple 3, 6	0,08
Exemple 2, 7	0,12
Exemple 4	0,11
Exemple 5	10,0

## REVENDICATIONS

1. Dérivés carboxy-réduits et chemiosélectivement O-sulfatés du Dermatan Sulfate, isolés ou en mélange, ainsi que leurs sels.

2. Dérivés carboxy-réduits et sulfatés du Dermatan Sulfate selon la revendication 1 de formule (I) :



dans laquelle  $R_1$  représente  $SO_3M$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  et  $R_4$ , identiques ou différents, représentent H ou  $SO_3M$ , étant entendu que l'un au moins des substituants  $R_2$ ,  $R_3$  et  $R_4$  représentent un groupement  $SO_3M$ ,  $n$  est un entier compris entre 0 et 150,  $M$  est un métal alcalin, les dits dérivés étant sous la forme d'un composé isolé ou sous forme de mélanges, ainsi que leurs diastéréoisomères.

3. Dérivés carboxy-réduits du Dermatan Sulfate selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que le  $M$  est choisi parmi sodium, calcium, magnésium et potassium.

4. Dérivés carboxy-réduits du Dermatan sulfate selon la revendication 2 ou 3 caractérisé en ce que  $M$  est un atome de sodium.

5. Dérivés carboxy-réduits du Dermatan sulfate selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisés en ce que  $R_2$  et  $R_3$  représentent  $SO_3Na$  et  $R_4$  représente H.

6. Dérivés carboxy-réduits du Dermatan sulfate selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisés en ce que  $R_2$ ,  $R_3$  et  $R_4$  représentent  $\text{SO}_3\text{Na}$ .

7. Dérivés carboxy-réduits du Dermatan sulfate selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisés en ce que  $R_2$  et  $R_4$  représentent  $\text{SO}_3\text{Na}$  et  $R_3$  représente H.

8. Dérivés carboxy-réduits du Dermatan sulfate selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisés en ce que  $R_2$  représente  $\text{SO}_3\text{Na}$  et  $R_3$  et  $R_4$  représentent H.

9. Procédé de préparation des dérivés carboxy-réduits du Dermatan sulfate selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans lequel on met en œuvre successivement les étapes suivantes :

- trans-salification du Dermatan Sulfate par un sel d'ammonium quaternaire,
  - Sulfatation en milieu organique, suivie d'une salification,
  - Carboxyréduction du Dermatan Sulfate persulfaté
    - soit a) au moyen d'un dérivé de carbodiimide (pour former un adduit activé) et en présence d'un agent réducteur ,
    - soit b) par estérification, le dérivé persulfaté étant le cas échéant préalablement trans-salifié par un sel d'ammonium quaternaire, suivie d'une réduction du dérivé ester correspondant par action un agent réducteur
  - Le cas échéant, trans-salification du dérivé persulfaté carboxy-réduit par un sel d'ammonium quaternaire puis resulfatation suivie d'une salification.

10. Procédé de préparation des dérivés carboxy-réduits du Dermatan Sulfate selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans lequel on met en œuvre successivement les étapes suivantes:

- Carboxyréduction du Dermatan Sulfate sel de sodium,
  - Soit a) au moyen d'un dérivé de carbodiimide ( pour former un adduit activé) et en présence d'un agent réducteur ,
  - soit b) par estérification, le Dermatan Sulfate sel de sodium étant le cas échéant préalablement trans-salifié par un sel d'ammonium quaternaire, suivie d'une réduction du dérivé ester correspondant par action un agent réducteur
- Trans-salification du dérivé carboxy-réduit par un sel d'ammonium quaternaire,
- Sulfatation en milieu organique suivie d'une salification.

11. Procédé selon les revendications 9 et 10 caractérisé en ce que la sulfatation s'effectue en milieu organique au moyen d'un complexe d'anhydride sulfurique avec une base organique telle que la pyridine ou la triméthylamine.

12. Procédé selon les revendications 9 à 11 caractérisé en ce que la sulfatation s'effectue à partir d'un sel de benzéthonium, en présence de 10 à 30 équivalents de complexe pyridine - anhydride sulfurique par fonction hydroxyle à sulfater, et à une température comprise entre -15 et 70 °C.

13. Procédé selon la revendication 10 caractérisé en ce que la sulfatation du Dermatan Sulfate trans-salifié s'effectue à environ 0°C lorsqu'on désire obtenir les composés 6,0-sulfatés du Dermatan Sulfate ou à environ



60°C lorsqu'on désire obtenir les composés persulfatés du Dermatan Sulfate.

14. Procédé selon la revendication 10 caractérisé en ce que la sulfatation du Dermatan Sulfate carboxy-réduit trans-salifié s'effectue à environ 0°C lorsqu'on désire obtenir les composés 6,6' O-sulfatés tels que définis à la revendication 5 ( $R_2=R_3=SO_3Na$  et  $R_4=H$ ) ou à environ 60°C lorsqu'on désire obtenir les composés persulfatés tels que définis à la revendication 6 ( $R_2=R_3=R_4=SO_3Na$ ).

15. Procédé selon la revendication 9 caractérisé en ce que la (re)sulfatation du Dermatan Sulfate carboxy-réduit trans-salifié sulfaté (Composés de formule (I) avec  $R_2=R_4=SO_3Na$  et  $R_3=H$ ) tels que définis à la revendication 7 s'effectue à environ 20°C lorsqu'on désire obtenir les composés persulfatés (Composés de formule (I) avec  $R_2=R_3=R_4=SO_3Na$ ) tels que définis à la revendication 6.

16. Procédé selon la revendication 9 caractérisé en ce que la (re)sulfatation du Dermatan Sulfate carboxy-réduit trans-salifié 6,O-sulfaté (composés de formule (I) avec  $R_2=SO_3Na$  et  $R_3=R_4=H$ ) s'effectue à environ -10°C lorsqu'on désire obtenir les composés 6,6'O-sulfatés (composés de formule (I) avec  $R_2=R_3=SO_3Na$  et  $R_4=H$ ) tels que définis à la revendication 5.

17. Procédé selon les revendications 9 et 10 caractérisé en ce que la carboxy-réduction s'effectue au moyen de chlorhydrate de 1-(3-diméthyl aminopropyl)-3-éthylcarbodiimide en présence du borohydrure de métal alcalin tel que le borohydrure de sodium.

18. Procédé selon la revendication 17 caractérisé en ce qu'on utilise 5 à 20 équivalents de chlorhydrate de 1-(3-diméthyl aminopropyl)-3-éthylcarbodiimide et à un pH compris entre 4 et 5 et en particulier entre 4,3 et 4,9.

19. Procédé selon les revendications 9 et 10 caractérisé en ce que la réduction de l'adduit activé du dérivé du Dermatan Sulfate est réalisée avec 10 à 300 équivalents et en particulier de 140 à 250 équivalents de borohydrure de métal alcalin tel que le borohydrure de sodium à une température comprise entre 10 et 70 °C et en particulier entre 20 et 50°C.

20. Procédé selon les revendications 9 et 10 caractérisé en ce que la carboxy-réduction s'effectue par réduction d'un ester tel que l'ester méthylique ou benzylique en présence de borohydrure de métal alcalin tel que le borohydrure de sodium.

21. Procédé selon la revendication 20 caractérisé en ce qu'on prépare l'ester méthylique à partir d'un dérivé du Dermatan Sulfate, sel de benzéthonium, en solution dans le dichlorométhane en présence de 2 à 20 équivalents et en particulier de 4 à 10 équivalents d'iodure de méthyle.

22. Procédé selon les revendications 20 à 21 caractérisé en ce que la réduction de l'ester du dérivé du dermatan sulfate est réalisée avec 10 à 300 équivalents de borohydrure de métal alcalin à une température comprise entre 10 et 50°C.

23. Procédé selon la revendication 22 caractérisé en ce que la réduction de l'ester est réalisée en présence de 140 à 250 équivalents de borohydrure de sodium à une température voisine de 20°C.

24. procédé selon la revendication 9 mettant en oeuvre les étapes suivantes :

- Trans-salification du Dermatan Sulfate par le chlorure de Benzéthonium
- Sulfatation du sel de benzéthonium du Dermatan Sulfate en milieu organique au moyen d'un complexe d'anhydride

sulfurique avec une base organique telle que la pyridine ou la triméthylamine suivie d'une salification avec l'acétate de sodium.

- Soit Carboxyréduction au moyen du chlorhydrate de 1-(3-diméthyl aminopropyl)-3-éthylcarbodiimide en présence du borohydrure de sodium,

- soit estérification par action du iodure de méthyle sur le dérivé Dermatan Sulfate préalablement trans-salifié par le chlorure de Benzéthonium puis réduction du dérivé ester méthylique par le borohydrure de sodium,

- puis le cas échéant trans-salification du dérivé persulfaté carboxy-réduit par le chlorure de Benzéthonium, puis resulfatation par le complexe d'anhydride sulfurique - pyridine suivie d'une salification par l'acétate de sodium.

25. procédé selon la revendication 10 mettant en oeuvre les étapes suivantes :

- Soit Carboxy-réduction du Dermatan sulfate sel de sodium au moyen du chlorhydrate de 1-(3-diméthyl aminopropyl)-3-éthylcarbodiimide en présence de borohydrure de sodium,

- soit estérification par action du iodure de méthyle sur le dérivé Dermatan Sulfate préalablement trans-salifié par un sel d'ammonium quaternaire puis réduction du dérivé ester méthylique par le borohydrure de sodium, puis

- trans-salification du dérivé carboxy-réduit par le chlorure de Benzéthonium

- Sulfatation par le complexe anhydride sulfurique - pyridine, suivie d'une salification par l'acétate de sodium.

26. Procédé d'obtention des dérivés isolés du Dermatan sulfate carboxy-réduits et chemiosélectivement O-sulfatés selon la revendication 1 à 8 à partir du mélange de dérivés carboxy-réduits du Dermatan sulfate tels qu'obtenus selon le procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 25, caractérisé en ce qu'on fractionne le mélange par chromatographie sur des colonnes remplies de gel de type polyacrylamide agarose ou un gel de polyacrylamide, le mélange étant élué par une solution d'hydrogénocarbonate de sodium, notamment de 0,1 à 1 mole/l.

27. A titre de médicaments les composés tels que définis à l'une quelconque des revendications 1 à 8.

28. A titre de médicaments selon la revendication 27, les composés tels que définis à l'une quelconque des revendications 1 à 8 pour traiter ou prévenir des désordres qui affichent une activité accrue d'au moins une des métalloprotéinases de matrice, telle que la matrilysine (MMP-7), l'elastase neutrophile, l'aggrécanase hADAMTS1 et la gélatinase A (MMP-2).

29. A titre de médicament selon la revendication 27 ou 28, les composés tels que définis à l'une quelconque des revendications 1 à 8 pour traiter ou prévenir des désordres tels que la dégénérescence articulaire, la spondylose, la chondrolyse, associée à un traumatisme de l'articulation ou une immobilisation prolongée de l'articulation, les désordres des tissus conjonctifs, les troubles de la cicatrisation de plaie, les désordres parodontaux, les désordres chroniques du système locomoteur, les arthropathies, les myalgies, ou les désordres du métabolisme osseux.

30. les compositions pharmaceutiques renfermant un médicament tel que défini à l'une quelconque des

revendications 27 à 29 et un ou plusieurs excipients pharmaceutiquement acceptables.

31. Dérivés carboxy-réduits et chemiosélectivement O-sulfatés du Dermatan Sulfate, isolés ou en mélange tels que définis à l'une quelconque des revendications 1 à 6 susceptibles d'être obtenus selon le procédé tel que défini à l'une quelconque des revendications 9 à 26.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2004/003226

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C08B37/00 A61K31/737		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C08B		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 88/00211 A (PHARMACIA AB) 14 January 1988 (1988-01-14) abstract page 2, line 22 - page 3, line 28 claims	1-8, 10-12
A	WO 92/13541 A (HOECHST AG) 20 August 1992 (1992-08-20) cited in the application page 2, line 17 - page 4, line 5 page 6, line 20 - page 7, line 2 abstract	1,9,10, 27-31
----- -/--		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex</span> </div>		
° Special categories of cited documents		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>*G* document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
10 June 2005	21/06/2005	
Name and mailing address of the ISA	Authorized officer	
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Mazet, J-F	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/003226

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 94/28889 A (NEOGENIX INC) 22 December 1994 (1994-12-22) cited in the application abstract page 12, line 1 - line 27 claims 18,22,24,25 -----	1,27,30, 31
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 200029 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2000-331701 XP002286685 & JP 2000 080102 A (SHIN NIPPON YAKUGYO KK) 21 March 2000 (2000-03-21) abstract & PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 2000, no. 06, 22 September 2000 (2000-09-22) & JP 2000 080102 A (SHIN NIPPON YAKUGYOU KK), 21 March 2000 (2000-03-21) abstract -----	1
A	BAZIN H G ET AL: "INHIBITION OF APOLIPOPROTEIN E-RELATED NEUROTOXICITY BY GLYCOSAMINOGLYCANS AND THEIR OLIGOSACCHARIDES" BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, PA, US, vol. 41, no. 25, 2002, pages 8203-8211, XP001196989 ISSN: 0006-2960 -----	
A	WO 92/01003 A (UNIV TEXAS) 23 January 1992 (1992-01-23) claims; figure 1 -----	1
A	TAYLOR R L ET AL: "STOICHIOMETRIC DEPOLYMERIZATION OF POLYURONIDES AND GLYCOSAMINOGLYCURONANS TO MONOSACCHARIDES FOLLOWING REDUCTION OF THEIR CARBODIIMIDE-ACTIVATED CARBOXYL GROUPS" BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, EASTON, PA, US, vol. 11, no. 8, 1972, pages 1383-1388, XP008032393 ISSN: 0006-2960 abstract ----- -/--	10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/003226

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	<p>WOLFROM M L ET AL: "CHONDROITIN SULFATE MODIFICATIONS. I. CARBOXYL-REDUCED CHONDROITIN AND CHONDROSINE" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, DC, US, vol. 82, 5 April 1960 (1960-04-05), pages 1673-1677, XP001193362 ISSN: 0002-7863 abstract</p> <p>-----</p>	10



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/003226

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8800211	A	14-01-1988	SE 453394 B SE 8603008 A WO 8800211 A1 US 4814437 A	01-02-1988 08-01-1988 14-01-1988 21-03-1989
WO 9213541	A	20-08-1992	AU 1154992 A WO 9213541 A1 ZA 9200605 A	07-09-1992 20-08-1992 30-09-1992
WO 9428889	A	22-12-1994	AU 7205894 A WO 9428889 A1	03-01-1995 22-12-1994
JP 2000080102	A	21-03-2000	NONE	
WO 9201003	A	23-01-1992	US 5262403 A AU 8306791 A WO 9201003 A1	16-11-1993 04-02-1992 23-01-1992

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR2004/003226

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C08B37/00 A61K31/737

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C08B

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no des revendications visées
A	WO 88/00211 A (PHARMACIA AB) 14 janvier 1988 (1988-01-14) abrégé page 2, ligne 22 - page 3, ligne 28 revendications	1-8, 10-12
A	WO 92/13541 A (HOECHST AG) 20 août 1992 (1992-08-20) cité dans la demande page 2, ligne 17 - page 4, ligne 5 page 6, ligne 20 - page 7, ligne 2 abrégé	1,9,10, 27-31
	----- -/--	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

10 juin 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21/06/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P B 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mazet, J-F

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no des revendications visées
A	WO 94/28889 A (NEOGENIX INC) 22 décembre 1994 (1994-12-22) cité dans la demande abrégé page 12, ligne 1 - ligne 27 revendications 18,22,24,25 -----	1,27,30, 31
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 200029 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2000-331701 XP002286685 & JP 2000 080102 A (SHIN NIPPON YAKUGYO KK) 21 mars 2000 (2000-03-21) abrégé & PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 2000, no. 06, 22 septembre 2000 (2000-09-22) & JP 2000 080102 A (SHIN NIPPON YAKUGYOU KK), 21 mars 2000 (2000-03-21) abrégé -----	1
A	BAZIN H G ET AL: "INHIBITION OF APOLIPOPROTEIN E-RELATED NEUROTOXICITY BY GLYCOSAMINOGLYCANS AND THEIR OLIGOSACCHARIDES" BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, PA, US, vol. 41, no. 25, 2002, pages 8203-8211, XP001196989 ISSN: 0006-2960 -----	
A	WO 92/01003 A (UNIV TEXAS) 23 janvier 1992 (1992-01-23) revendications; figure 1 -----	1
A	TAYLOR R L ET AL: "STOICHIOMETRIC DEPOLYMERIZATION OF POLYURONIDES AND GLYCOSAMINOGLYCURONANS TO MONOSACCHARIDES FOLLOWING REDUCTION OF THEIR CARBODIIMIDE-ACTIVATED CARBOXYL GROUPS" BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, EASTON, PA, US, vol. 11, no. 8, 1972, pages 1383-1388, XP008032393 ISSN: 0006-2960 abrégé ----- -/--	10

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR2004/003226

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>WOLFROM M L ET AL: "CHONDROITIN SULFATE MODIFICATIONS. I. CARBOXYL-REDUCED CHONDROITIN AND CHONDROSINE"</p> <p>JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, DC, US,</p> <p>vol. 82, 5 avril 1960 (1960-04-05), pages 1673-1677, XP001193362</p> <p>ISSN: 0002-7863</p> <p>abrégé</p> <p>-----</p>	10

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR2004/003226

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 8800211	A	14-01-1988	SE 453394 B	01-02-1988
			SE 8603008 A	08-01-1988
			WO 8800211 A1	14-01-1988
			US 4814437 A	21-03-1989
-----				
WO 9213541	A	20-08-1992	AU 1154992 A	07-09-1992
			WO 9213541 A1	20-08-1992
			ZA 9200605 A	30-09-1992
-----				
WO 9428889	A	22-12-1994	AU 7205894 A	03-01-1995
			WO 9428889 A1	22-12-1994
-----				
JP 2000080102	A	21-03-2000	AUCUN	
-----				
WO 9201003	A	23-01-1992	US 5262403 A	16-11-1993
			AU 8306791 A	04-02-1992
			WO 9201003 A1	23-01-1992
-----				