

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE (19)
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE



المملكة المغربية

المكتب المغربي
للملكية الصناعية والتجارية

(12) BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication : **MA 27393 A1** (51) Cl. internationale : **C12Q 1/527**

(43) Date de publication :
01.06.2005

(21) N° Dépôt :
28129

(22) Date de Dépôt :
03.03.2005

(30) Données de Priorité :
23.09.2002 FR 02/11724

(86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT:
PCT/FR2003/002782 22.09.2003

(71) Demandeur(s) :
AVENTIS PHARMA S.A., 20 AVENUE RAYMOND ARON F-92160 ANTONY (FR)

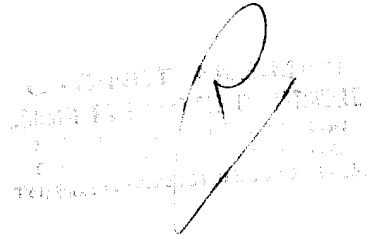
(72) Inventeur(s) :
MOURIER, Pierre ; VISKOV, Christian

(74) Mandataire :
CABINET AKSIMAN

(54) Titre : **METHODE DE DETERMINATION DE GROUPEMENTS SPECIFIQUES
CONSTITUANT LES HEPARINES OU LES HEPARINES DE BAS POIDS
MOLECULAIRE**

ABREGE

L'invention a pour objet une méthode d'analyse des héparines ou des héparines de bas poids moléculaire caractérisée en ce que l'échantillon à doser est dépolymérisé par action d'héparinases puis le cas échéant le dépolymérisat obtenu est réduit puis on effectue une analyse par chromatographie liquide Haute Performance.

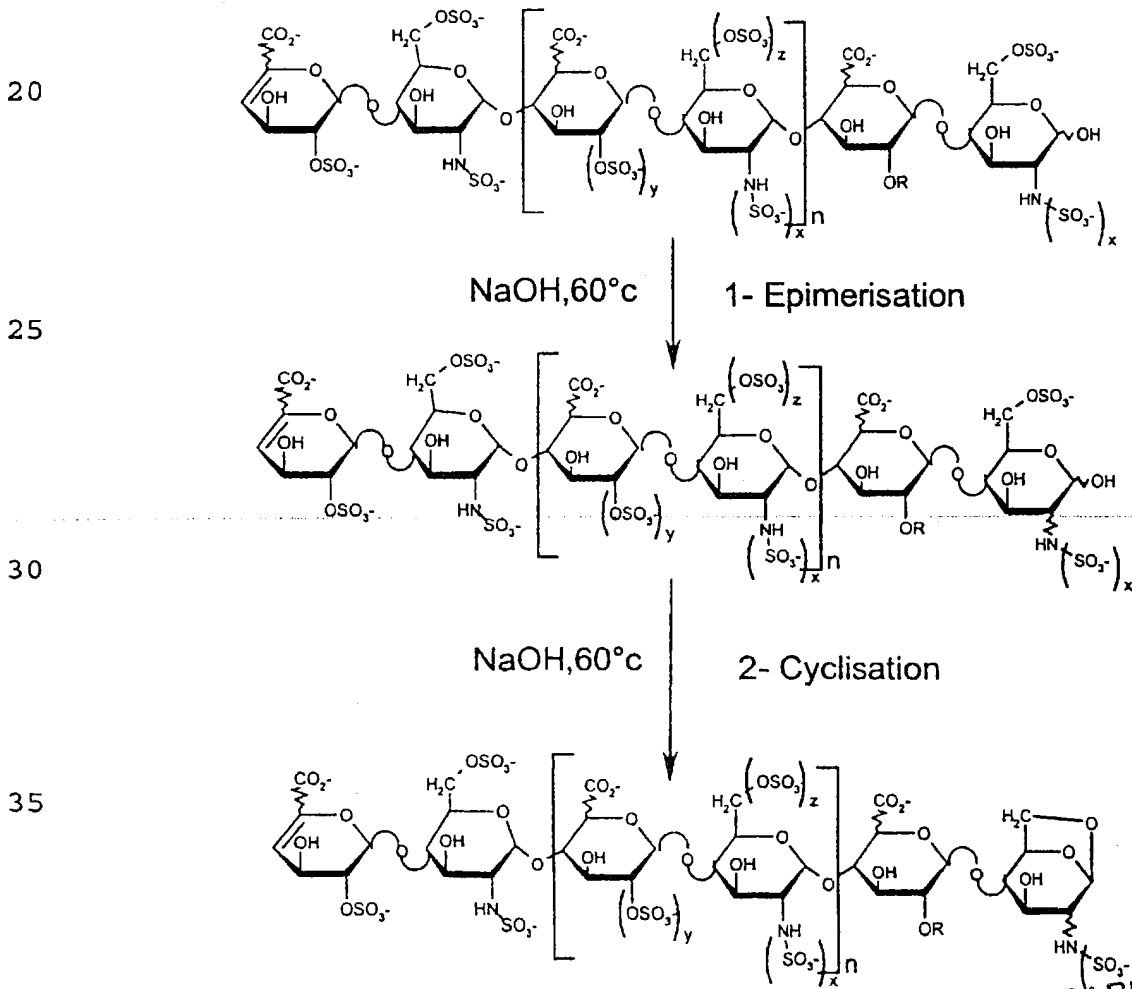
A faint, circular stamp is visible, partially obscured by a large, handwritten signature in black ink. The stamp contains illegible text, likely an official seal or registration mark. The signature is a stylized, cursive script.

Méthode de détermination de groupements spécifiques constituant les héparines ou les héparines de bas poids moléculaire

La présente invention a pour objet une méthode d'analyse de groupements spécifiques constituant les héparines ou les héparines de bas poids moléculaire.

Lors du procédé de préparation de l'Enoxaparine (Lovenox®) (US5,389,618) à partir de l'héparine pure, L'étape de procédé de dépolymérisation alcaline en phase aqueuse produit une transformation partielle mais caractéristique des glucosamines des terminaisons réductrices des chaînes oligosaccharidiques.

La première étape de cette transformation consiste en une épimerisation glucosamine↔mannosamine (T. Toida and al, J. Carbohydrate Chemistry, 15(3), 351-360 (1996)); la deuxième étape est une 6-O desulfatation de la glucosamine conduisant à la formation de dérivés nommés « 1,6 anhydro » (demande de brevet internationale WO01/29055).



CABINET AKSIMAN
 PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

Ce type de dérivé n'est obtenu que pour les chaînes oligosaccharidiques dont la glucosamine terminale est 6-O sulfatée.

Le pourcentage de chaînes oligosaccharidiques dont la terminaison est modifiée par une liaison 1,6-anhydro est une caractéristique structurale du mélange d'oligosaccharide du Lovenox et doit pouvoir être mesuré.

La présente invention consiste donc en une méthode d'analyse des héparines, des héparines de bas poids moléculaire et plus particulièrement du Lovenox.

La méthode d'analyse selon l'invention est la suivante :

L'échantillon à doser est dépolymérisé par action d'héparinases puis le cas échéant le dépolymérisat obtenu est réduit puis on effectue une analyse par chromatographie liquide Haute Performance.

La méthode telle que définie plus haut est donc caractérisée en ce que l'on recherche la présence de chaînes oligosaccharides dont la terminaison est modifiée par une liaison 1,6-anhydro (« Groupements 1,6 anhydro »).

En particulier, l'échantillon à doser est tout d'abord dépolymérisé de façon exhaustive par un mélange d'héparinases et notamment d'héparinase 1 (EC 4.2.2.7.), d'héparinase 2 (heparin lyase II) et d'héparinase 3 (EC4.2.2.8.). (Ces enzymes sont commercialisées par la société Grampian Enzymes).

L'invention a donc pour objet une méthode d'analyse des héparines ou des héparines de bas poids moléculaire caractérisée en ce qu'on effectue les étapes suivantes :

- 1)Dépolymérisation de l'échantillon par action d'héparinases
- 2)le cas échéant réduction du dépolymérisat
- 3)Dosage par Chromatographie liquide Haute Performance.

L'invention a plus particulièrement pour objet la méthode telle que définie plus haut caractérisée en ce que les héparinases sont sous forme d'un mélange d'héparinase 1 (EC 4.2.2.7.), d'héparinase 2 (heparin lyase II) et d'héparinase 3 (EC.4.2.2.8.)

Le dépolymérisat ainsi préparé est ensuite traité de

préférence par une solution de NaBH_4 dans l'acétate de sodium. Cette dernière opération permet de réduire spécifiquement les extrémités réductrices qui ne sont pas sous la forme 1,6 anhydro (produits décrits dans la demande de brevet WO 5 01/72762). Enfin, pour pouvoir quantifier les disaccharides 1 et 2 décrits plus bas, l'échantillon d'héparine de bas poids moléculaire, dépolymérisé par les héparinases, doit être réduit par l'action d'un agent réducteur tel que NaBH_4 .

L'invention a donc plus particulièrement pour objet la 10 méthode telle que définie plus haut caractérisée en ce que l'héparine dépolymérisée est ensuite réduite.

L'invention a tout particulièrement pour objet la méthode telle que définie précédemment caractérisée en ce que l'agent de réduction est le NaBH_4 . On pourra éventuellement 15 utiliser un autre sel de métal alcalin du borohydrure tel que le lithium ou le potassium.

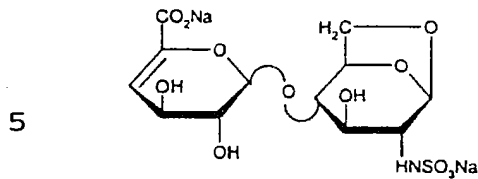
Le dosage des terminaisons 1,6 anhydro est ensuite réalisé par CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) et en particulier par chromatographie échangeuse d'anions.

20 La méthode de dosage selon l'invention permet de bien différencier le Lovenox des autres héparines de bas poids moléculaire qui ne renferment pas ces dérivés « 1,6-anhydro ». Inversement, la méthode de dosage selon l'invention permet de s'assurer que des héparines de bas 25 poids moléculaire ne remplissent pas les caractéristiques physico-chimiques du Lovenox et donc sont de nature différente.

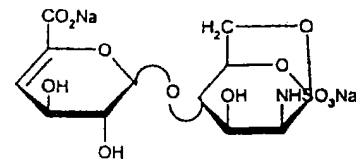
La méthode de dosage selon l'invention peut-être appliquée au procédé industriel lors des contrôles 30 d'échantillons au cours du procédé, afin d'assurer une standardisation du procédé de fabrication du Lovenox et obtenir des lots uniformes.

Après dépolymérisation enzymatique et réduction des extrémités réductrices, on trouve les dérivés 1,6-anhydro du 35 Lovenox sous 4 formes essentielles. L'invention a donc également pour objet la méthode telle que décrite précédemment caractérisée en ce que les résidus 1,6-anhydro obtenus lors de la réaction de dépolymérisation sont les

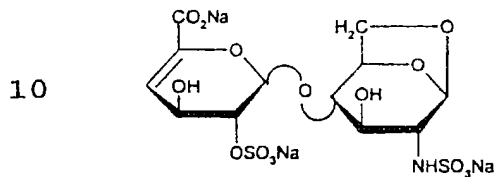
suivants :



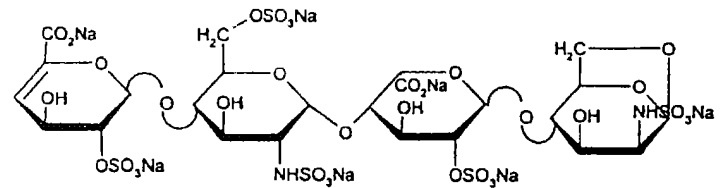
disaccharide 1



disaccharide 2



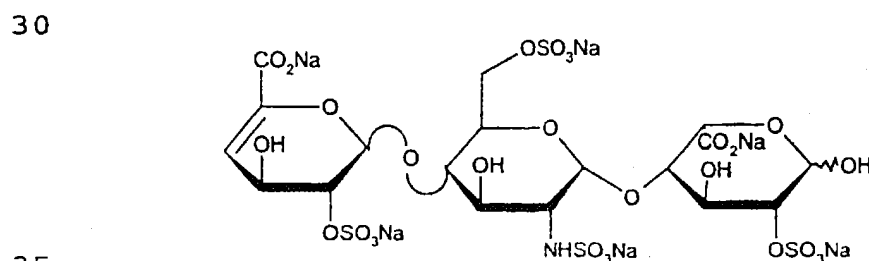
disaccharide 3



tétrasaccharide 1

15 Tous les oligosaccharides ou polysaccharides qui
comportent l'extrémité 1,6-anhydro sur l'unité
disaccharidique terminale et qui ne possèdent pas un 2-0
sulfate sur l'acide uronique, du dit disaccharide terminal,
sont totalement dépolymérisés par les héparinases et sous la
20 forme des disaccharides 1 et 2. Par contre, Lorsque le dit
saccharide terminal comporte un 2-0 sulfate sur l'acide
uronique et qu'il est sous la forme mannosamine, le dérivé
1,6 anhydro se retrouve sous la forme du tétrasaccharide 1
(forme résistante aux héparinases).

25 Le trisaccharide 1 (voir plus bas), est également
présent dans le mélange. Il est issu d'un autre processus de
dégradation qui conduit à la structure ci-après (phénomène de
peeling observé dans lors de la dépolymérisation chimique du
Lovenox.

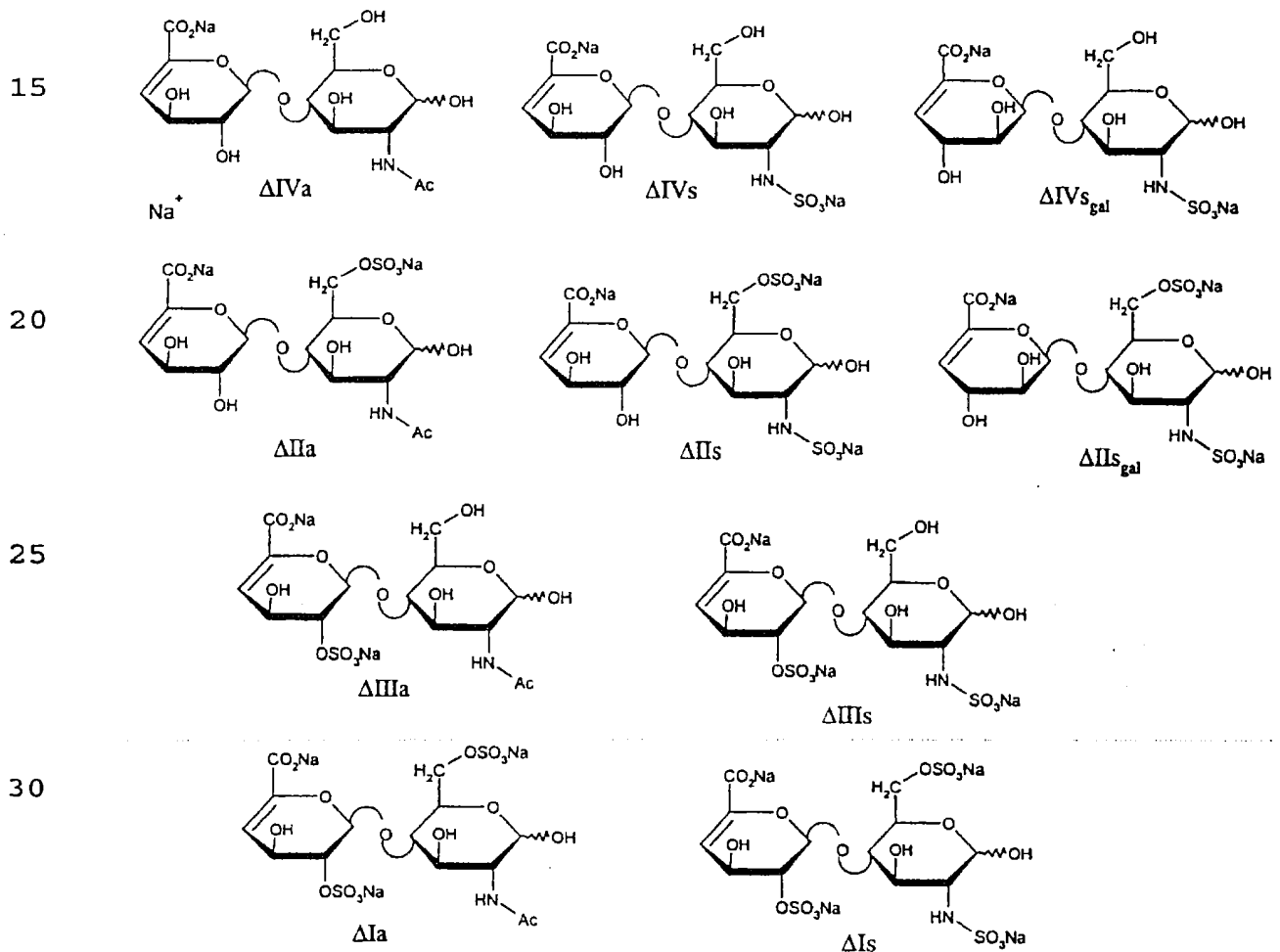


35
trisaccharide 1

Les autres constituants du mélange ne sont pas

caractéristiques uniquement du Lovenox. On trouve bien entendu les 8 disaccharides élémentaires de la chaîne héparinique. Ces 8 disaccharides élémentaires sont commercialisés entre autre par la société Sigma.

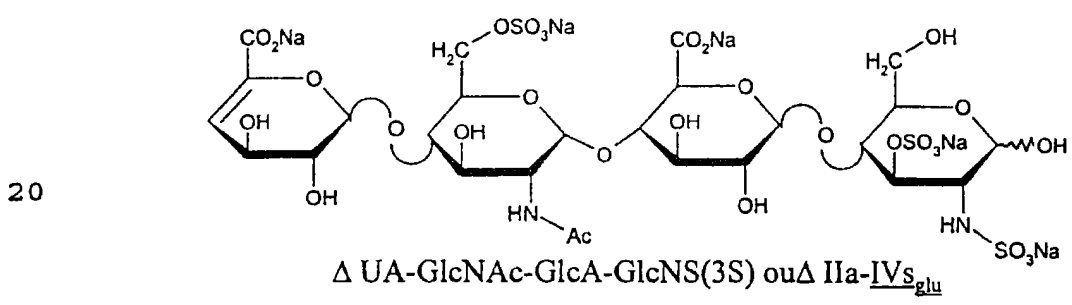
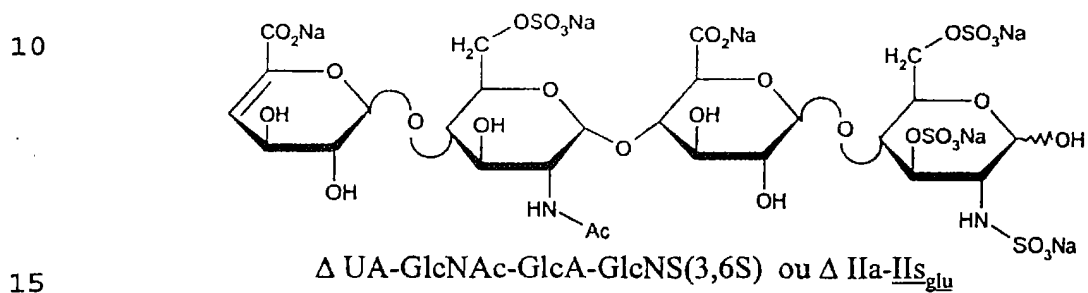
5 D'autres disaccharides ont été identifiés dans le mélange par la méthode selon l'invention: les disaccharides $\Delta\text{IIIs}_{\text{gal}}$ et $\Delta\text{IVs}_{\text{gal}}$ qui ont pour origine la 2-0 desulfatation alcaline de -IdoA(2S)-GlcNS(6S)- et de -IdoA(2S)-GlcNS- conduisant à la formation de 2 acides galacturoniques. Il ne
10 sont pas habituellement présents dans la structure originelle de l'héparine (U.M. Desai et Coll. Arch. Biochem. Biophys., 306 (2) 461-468 (1993)).



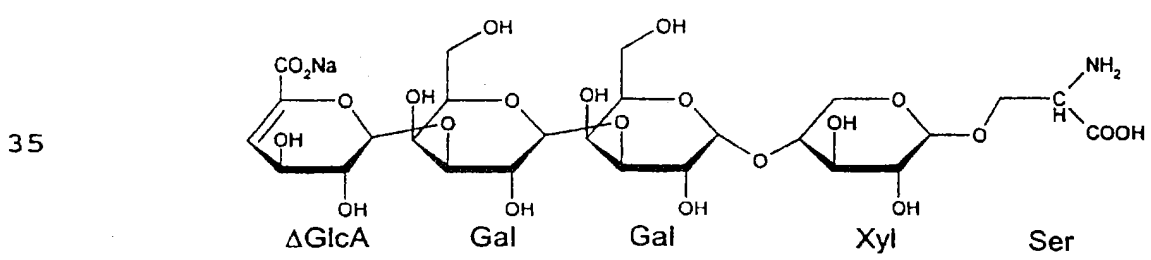
Les oligosaccharides comportant des glucosamines 3-0 sulfatés résistent au clivage par les héparinases et restent présents sous forme de tétrasaccharides.

CABINET AKSIMAN
 INGENIEUR EN PHARMACIE INDUSTRIELLE

Dans le cas de la plupart des héparines de bas poids moléculaire, l'héparine est extraite du mucus de porc, et ces tétrasaccharides principaux sont représentés plus bas. Ils sont résistants à la dépolymérisation enzymatique et sont le reflet des séquences affines à l'antithrombine III. Ils sont symbolisés ainsi : Δ Ia-IIS_{glu} et Δ Ia-IVS_{glu}. (S.YAMADA, K.YOSHIDA, M. SUGIURA, K.SUGAHARA, K-H KHOO, H.R. MORRIS, A. DELL, J.Biol.Chem. ; 270(7), 4780-4787 (1993)



25 Le dernier constituant du mélange clivé par les héparinases est la terminaison glycosérine Δ GlcA-Gal-Gal-Xyl-Ser (K.SUGAHARA, H.TSUDA, K.YOSHIDA, S.YAMADA, J.Biol.Chem. ; 270(39), 22914-22923 (1995) ; K.SUGAHARA, S.YAMADA, K.YOSHIDA, P. de WAARD, J.F.G. Vliegenthart ; J.Biol.Chem. ; 30 267(3), 1528-1533 (1992). Ce dernier est généralement presque absent du Lovenox (Voir RMN à l'exemple 5).



CABINET ANKORAN
 2004/027087
 2004/027087
 2004/027087

Un autre aspect de l'invention se situe au niveau du procédé de chromatographie utilisé pour la détermination des groupements 1,6-anhydro. Tout d'abord il s'agit de séparer les différents polysaccharides obtenus après dépolymérisation et traitement par un agent réducteur tel que le NaBH_4 .

La chromatographie d'échange d'anions (SAX) est la méthode séparative la plus adaptée à un tel mélange complexe.

Les colonnes remplies d'une phase stationnaire du type Spherisorb SAX de granulométrie $5 \mu\text{m}$ et d'une longueur de 25 cm peuvent être utilisées. Tous les diamètres de colonne classiques, compris entre 1mm et 4.6 mm sont utilisables.

L'appareillage utilisé peut-être un chromatographe permettant la formation de gradient d'élution avec un détecteur UV, plus préférablement muni d'une barrette de diodes afin de pouvoir réaliser des spectres UV des constituants et d'enregistrer des signaux complexes, résultant de la différence entre les absorbances à 2 longueurs d'ondes différentes et permettant la détection spécifiques des oligosaccharides acétylés. Pour permettre ce type de détection, des phases mobiles transparentes dans l'UV jusqu'à 200 nm sont préférables. Ceci exclut les phases mobiles classiques à base de NaCl qui ont par ailleurs l'inconvénient de nécessiter un chromatogramme passivé afin de résister au pouvoir corrosif des chlorures. La phase mobile utilisée ici sera de préférence à base de perchlorate de sodium, mais les sels de méthane sulfonate ou phosphate peuvent aussi être utilisés.

Le pH préconisé pour la séparation est de 2 à 6,5. Préférentiellement, on utilisera un pH voisin de 3. Il est contrôlé ici par addition d'un sel tel que le phosphate possédant un pouvoir tampon à $\text{pH} = 3$ meilleur que celui des perchlorates.

A titre d'exemple, on donne ci-après des conditions standard de séparation chromatographique :

Solvant A : NaH_2PO_4 2,5mM porté à $\text{pH} 2,9$ par addition de H_3PO_4

Solvant B : NaClO_4 1N- NaH_2PO_4 2,5mM porté à $\text{pH} 3,0$ par addition de H_3PO_4

Le gradient d'élution peut être le suivant :

T=0min : %B = 3 ; T= 40 min: %B = 60 ; T = 60 min :
%B = 80

La présente invention a donc également pour objet une
5 méthode d'analyse telle que définie plus haut par séparation
par chromatographie par échange d'anions caractérisée en ce
qu'on utilise la phase mobile transparente dans l'UV jusqu'à
200nm.

L'invention a plus particulièrement pour objet une phase
10 mobile telle que définie plus haut à base de perchlorate de
sodium, de sels de méthane sulfonate ou de sels de phosphate.

Un autre aspect tout à fait important se trouve dans la
méthode de détection.

Une méthode a été développée afin d'accroître la
15 spécificité de la détection UV. Comme les polysaccharides non
acétylés ont tous, à un pH donné, un spectre UV assez proche,
il est possible de détecter sélectivement les sucres acétylés
en prenant comme signal la différence entre l'absorbance à 2
longueurs d'onde choisies de telle manière que l'absorptivité
20 des saccharides non acétylés s'annule.

Dans le cas ci-dessous, on choisira 202 nm et 230 nm
comme longueurs d'onde de détection et de référence et l'on
notera le signal 202 - 230 nm. Le choix est bien entendu
dépendant du pH de la phase mobile (des ajustements de
25 quelques nm peuvent être nécessaires pour être à l'optimum
des dites conditions). Le détecteur le plus adapté à cette
technique est le détecteur DAD 1100 de la société Agilent
Technologies. Dans ce cas, une double détection sera réalisée
à 234 nm d'une part, et à 202-230 nm d'autre part. Le
30 principe de détection sélective des oligosaccharides acétylés
est illustré sur la figure ci-dessous dans laquelle le
spectre UV d'un disaccharide sulfaté Delta 1s est comparé
avec celui d'un disaccharide acétylé Delta 1a

CAHINET ASSIMAN
SOCIÉTÉ D'ÉTUDES ET DE RECHERCHES
100, rue de la République
92000 NANTERRE
TÉLÉPHONE 01 1 47 33 50 00

procédé de dépolymérisation et de réduction choisis parmi le disaccharide 1, le disaccharide 2, le disaccharide 3 et le Trisaccharide 1.

Les exemples ci-dessous illustrent l'invention sans toutefois avoir un caractère limitatif

Exemple 1 :

La dépolymérisation enzymatique est réalisée pendant 48 heures à température ambiante en mélangeant 50 μ l d'une solution à 20 mg/ml de l'héparine de bas poids moléculaire à 10 doser, 200 μ l d'une solution 100mM acide acétique/NaOH à pH 7.0 contenant 2 mM d'acétate de calcium et 1 mg/ml de BSA avec 50 μ l de la solution mère des 3 héparinases.

La réduction est réalisée sur 60 μ l du produit dépolymérisé par les héparinases en rajoutant 10 μ l d'une 15 solution de NaBH_4 à 30 g/l dans l'acétate de sodium 100 mM préparée extemporanément. On notera que les héparinases sont conservées à -30°C . Les héparinases sont en solution tampon et leur titre est de 0.5 UI/ml (Composition de la solution tampon : solution aqueuse pH 7 de KH_2PO_4 à une concentration 20 0.01 mole/l et additionnée de sérum d'albumine bovine (BSA) à 2 mg/ml).

Exemple 2 :

RMN du Disaccharide 3 obtenu selon le procédé décrit 25 plus haut

Spectre proton dans D_2O , 400 MHz, $T=298\text{K}$, δ en ppm: 3,34 (1H, dd, $J=7$ et 2Hz, H2), 3,72 (1H, t, $J=8\text{Hz}$, H6), 3,90 (1H, m, H3), 4,03 (1H, s, H4), 4,20 (1H, d, $J=8\text{Hz}$, H6), 4,23 (1H, t, $J=5\text{Hz}$, H3'), 4,58 (1H, m, H2'), 4,78 (1H, m, H5), 5,50 30 (1H, s, H1), 5,60 (1H, dd, $J=6$ et 1Hz, H1'), 6,03 (1H, d, $J=5\text{Hz}$, H4')].

Exemple 3

RMN du Tetrasaccharide 1 obtenu selon le procédé décrit 35 plus haut.

Spectre proton dans D_2O , 400 MHz, $T=298\text{K}$, δ en ppm: 3,15 (1H, s, H2), 3,25 (1H, m, H2''), 3,60 (1H, m, H3''), entre 3,70 et 4,70 (14H, massif, H3/H4/H6, H2'/H3'/H4'/H5',

[Signature]

12

H4''/H5''/H6'', H2'''/H3'''), 4,75 (1H, m, H5), entre 5,20 et 5,40 (2H, m, H1' et H1''), 5,45 (1H, m, H1'''), 5,56 (1H, m, H1), 5,94 (1H, d, J=5Hz, H4)

Exemple 4 :

5 RMN du Trisaccharide 1 obtenu selon le procédé décrit plus haut.

Spectre dans D₂O, 600 MHz (δ en ppm) : 3,28 (1H, m), 3,61 (1H, t, 7Hz), 3,79 (1H, t, 7Hz), 3,95 (1H, d, 6Hz), 4,00 (1H, s), 4,20 (1H, m), 4,28 (2H, m), 4,32 (1H, d, 4Hz), 4,41 (1H, s), 4,58 (1H, s), 4,61 (1H, s), 4,90 (1H, s large), 5,24 (1H, s), 5,45 (1H, s), 5,95 (1H, s).

Exemple 5 :

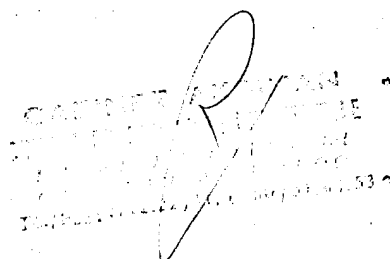
RMN du Δ GlcA-Gal-Gal-Xyl-Ser

15 Spectre dans D₂O, 500 MHz (δ en ppm) : 3,30 (1H, t, 7Hz), 3,34 (1H, t, 8Hz), 3,55 (1H, t, 7Hz), 3,60 (1H, t, 7Hz), entre 3,63 et 3,85 (10H, m), 3,91 (2H, m), 3,96 (1H, dd, 7 et 2Hz), entre 4,02 et 4,10 (3H, m), 4,12 (1H, d, 2Hz), 4,18 (1H, m), 4,40 (1H, d, 6Hz), 4,46 (1H, d, 6Hz), 4,61 (1H, d, 20 6Hz), 5,29 (1H, d, 3Hz), 5,85 (1H, d, 3Hz).

Exemple 6 : Principe de la quantification

Dans la méthode selon l'invention, il est fait comme hypothèse, largement admise, que tous les oligosaccharides 25 insaturés contenus dans le mélange ont la même absorptivité molaire, égale à 5500 mole⁻¹.l.cm⁻¹.

Il est donc possible de déterminer le pourcentage en poids de tous les constituants du mélange dépolymérisé dans l'héparine de bas poids moléculaire de départ. Pour les 4 30 dérivés 1,6 anhydro qui correspondent aux pics 7,8,13 et 19, on obtient les pourcentages en poids suivants:



$$\% w/w_{7+8} = 100 \cdot \frac{443 \cdot (Area_7 + Area_8)}{\sum Mw_x \cdot Area_x} ;$$

5
$$\% w/w_{13} = 100 \cdot \frac{545 \cdot Area_{13}}{\sum Mw_x \cdot Area_x}$$

$$\% w/w_{19} = 100 \cdot \frac{1210 \cdot Area_{13}}{\sum Mw_x \cdot Area_x}$$

10

Area₇ , Area₈ , Area₁₃ et Area₁₉ correspondent aux aires de chacun des pics 7,8,13 et 19. Les masses molaires de chacun de ces 4 composés sont respectivement 443, 443, 545 et 1210. $\sum Mw_x \cdot Area_x$ correspond au rapport de l'aire de chaque

pic du chromatogramme par la masse molaire du produit

20 correspondant.

Si M_w est la masse moyenne de l'héparine de bas poids moléculaire étudiée, le pourcentage de chaînes oligosaccharidiques se terminant par un cycle 1,6 anhydro est obtenu de la façon suivante :

25 Les masses moléculaires des constituants sont les suivantes :

Oligosaccharide	Oligosaccharide après réduction	Masse moléculaire
1	1	741
2	20	401
3	3	734
4	21	461
5	22	461
6	23	503
7	7	443
8	8	443
9	24	503
10	25	563
11	26	563
12	27	563

14		
13	13	545
14	28	605
15	29	1066
16	30	665
17	31	965
18	32	1168
19	19	1210

Nomenclature des saccharides et correspondance avec les pics selon les figures 1 et 2

5

IdoA : acide - α -L-Idopyranosyluronique;

GlcA : : acide - β -D-Glucopyranosyluronique;

Δ GlcA : acide 4,5-insaturaté : acide 4-déoxy- α -L-threo-hex-4-ene-pyranosyluronique

10

Gal : D-Galactose ;

Xyl : xylose ;

GlcNAc : 2-deoxy-2-acetamido- α -D-glucopyranose;

GlcNS : 2-deoxy-2-sulfamido- α -D-glucopyranose;

2S : 2-O sulfate ,

15

3S : 3-O sulfate ,

6S : 6-O sulfate

1 : Δ GlcA β 1-3 Gal β 1-3 Gal β 1-4 Xyl β 1-O-Ser

2 : acide 4-déoxy- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronique-

(1 \rightarrow 4)-2-déoxy-2-acétamido- α -D-glucopyranosyl sel de sodium

20

3 : Δ GlcA β 1-3 Gal β 1-3 Gal β 1-4 Xyl β 1-O-CH₂-COOH

4: acide 4-deoxy- α -L-threo-hex-4-ene-galactopyranosyluronique-(1 \rightarrow 4)-2-deoxy-2-sulfamido- β -D-glucopyranose sel de disodium

5: acide 4-déoxy- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronique-

25

(1 \rightarrow 4)-2-déoxy-2-sulfamido- α -D-glucopyranosyl sel de disodium

6: acide 4-déoxy- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronique-

(1 \rightarrow 4)-2-déoxy-2-acétamido-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl sel de disodium

30

7: acide 4-deoxy- α -L-threo-hex-4-ene-pyranosyluronique-

(1 \rightarrow 4)-1,6-anhydro-2-deoxy-2-sulfamido- β -D-glucopyranose sel

de disodium (disaccharide 1)

8: acide 4-deoxy- α -L-threo-hex-4-ene-pyranosyluronique-(1 \rightarrow 4)-1,6-anhydro-2-deoxy-2-sulfamido- β -D-mannopyranose sel de disodium (Disaccharide 2)

5 9: acide 4-désoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronique-(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-acétamido- α -D-glucopyranosyl sel de disodium

10 10: acide 4-deoxy- α -L-threo-hex-4-ene-galactopyranosyluronique-(1 \rightarrow 4)-2-deoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo- β -D-glucopyranose sel de triisodium

11 : acide 4-désoxy- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronique-(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl sel de trisodium

15 12 : acide 4-désoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronique-(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-sulfamido- α -D-glucopyranosyl sel de trisodium

13 : acide 4-deoxy-2-O-sulfo- α -L-threo-hex-4-ene-pyranosyluronique-(1 \rightarrow 4)-1,6-anhydro-2-deoxy-2-sulfamido- β -D-glucopyranose sel de trisodium (Disaccharide 3)

20 14 : acide 4-désoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronique-(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-acétamido-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl sel de trisodium

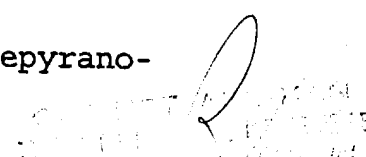
25 15 : acide 4-désoxy- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronique-(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-acétamido-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-acide β -D-glucopyranosyluronique-(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-sulfamido-3-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl) sel de pentasodium

16 : acide 4-désoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronique-(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl sel de tétrasodium

30 17 : acide 4-désoxy- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronique-(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-acétamido-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-acide β -D-glucopyranosyluronique-(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-sulfamido-3,6-di-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl) sel d'hexasodium

35 18 : acide 4-désoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronique-(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo-D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-acide-2-O-sulfo α -L-idopyranosyluronique sel d'hexasodium

19: acide 4-désoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyl-



syluronique-(1→4)-2-désoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl-(1→4)-acide-2-O-sulfo α -L-idopyranosyluronique-(1→4)-1,6-anhydro-2-deoxy-2-sulfamido- β -D-mannopyranose, sel de heptasodium (tétracaccharide 1)

5 20 : acide 4-désoxy- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronique-(1→4)-2-désoxy-2-acétamido- α -D-glucitol sel de sodium

 21 : acide 4-deoxy- α -L-threo-hex-4-ene-galactopyranosyluronique-(1→4)-2-deoxy-2-sulfamido- β -D-glucitol sel de disodium

10 22 : acide 4-désoxy- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronique-(1→4)-2-désoxy-2-sulfamido- α -D-glucitol sel de disodium

 23 : acide 4-désoxy- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronique-(1→4)-2-désoxy-2-acétamido-6-O-sulfo- α -D-glucitol sel de disodium

15 24 : acide 4-désoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronique-(1→4)-2-désoxy-2-acétamido- α -D-glucitol sel de disodium

 25 : acide 4-deoxy- α -L-threo-hex-4-ene-galactopyranosyluronique-(1→4)-2-deoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo- β -D-

20 glucitol sel de triisodium

 26 : acide 4-désoxy- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronique-(1→4)-2-désoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-glucitol sel de trisodium

25 27 : acide 4-désoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronique-(1→4)-2-désoxy-2-sulfamido- α -D-glucitol sel de trisodium

 28 : acide 4-désoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronique-(1→4)-2-désoxy-2-acétamido-6-O-sulfo- α -D-glucitol sel de trisodium

30 29 : acide 4-désoxy - α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronique-(1→4)-2-désoxy-2-acétamido-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl-(1→4)-acide β -D-glucopyranosyluronique-(1→4)-2-désoxy-2-sulfamido-3-O-sulfo- α -D-glucitol) sel de pentasodium

35 30 : acide 4-désoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronique-(1→4)-2-désoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-glucitol sel de tétrasodium

 31 : acide 4-désoxy - α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronique-(1→4)-2-désoxy-2-acétamido-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl-

(1→ 4)-acide β -D-glucopyranosyluronic-(1→ 4)-2-désoxy-2-sulfamido-3,6-di-O-sulfo- α -D-glucitol) sel d'hexasodium

32 : acide 4-désoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-
enepyranosyluronic-(1→ 4)-2-désoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo-
5 α -D-glucopyranosyl-(1→ 4)-acide -2-O-sulfo- α -L-
idopyranosyluronic sel d'hexasodium (forme réduite par
NaBH₄).

10

Figure 1

Séparation chromatographique de l'Enoxaparine
dépolymérisée par les héparinases avant et après réduction
par NaBH₄ (Signal en noir fin : UV à 234nm ; Signal en noir
épais UV : 202 - 234nm)

15

Figure 2 : Séparation chromatographique de l'héparine
dépolymérisée par les héparinases avant et après réduction
par NaBH₄ (Signal en noir fin : UV à 234nm ; Signal en noir
épais : UV : 202 - 234nm)

Handwritten signature and stamp.

REVENDEICATIONS

- 1) Méthode d'analyse des héparines ou des héparines de bas poids moléculaire caractérisée en ce qu'on effectue les étapes suivantes :
- 5 1 - Dépolymérisation de l'échantillon par action d'héparinases
- 2 - le cas échéant réduction du dépolymérisat
- 3 - Dosage par Chromatographie liquide Haute Performance.
- 10 2) Méthode telle que définie à la revendication 1 caractérisée en ce que l'on recherche la présence de chaînes oligosaccharides dont la terminaison est modifiée par une liaison 1,6-anhydro.
- 15 3) Méthode telle que définie à la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce que les héparinases sont sous forme d'un mélange d'héparinase 1 (EC 4.2.2.7.), d'héparinase 2 (heparin lyase II) et d'héparinase 3 (EC.4.2.2.8.)
- 20 4) Méthode telle que définie à la revendication 1 caractérisée en ce que l'héparine dépolymérisée par action d'héparinase (dépolymérisat) est ensuite soumise à un agent de réduction.
- 25 5) Méthode telle que définie à la revendication 4 caractérisée en ce que l'agent de réduction est le NaBH_4 ou un sel de métal alcalin de l'anion borohydrure.
- 30 6) Méthode telle que définie à la revendication 1 dans laquelle la méthode chromatographique utilisée est une chromatographie par échange d'anion.
- 35 7) Méthode telle que définie à la revendication 6 caractérisée en ce que l'on utilise une phase mobile transparente dans l'UV jusqu'à 200 nm.
- 8) Méthode telle que définie à la revendication 6 ou 7 caractérisée en ce que la phase mobile utilisée est à base de

SECRET R/1

perchlorate de sodium, les sels de méthane sulfonate ou les sels de phosphate.

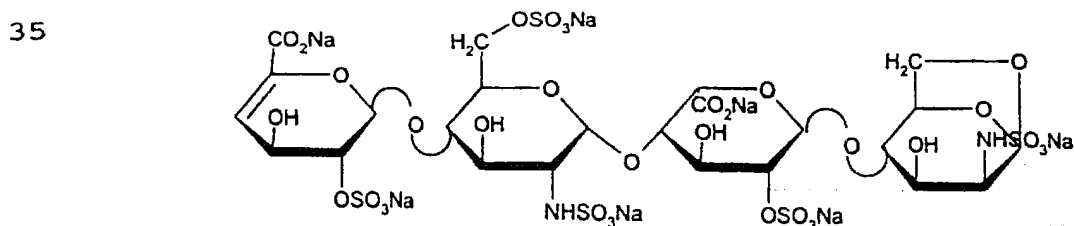
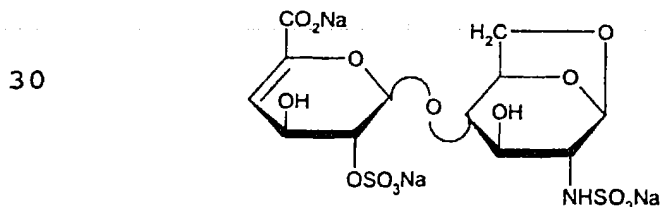
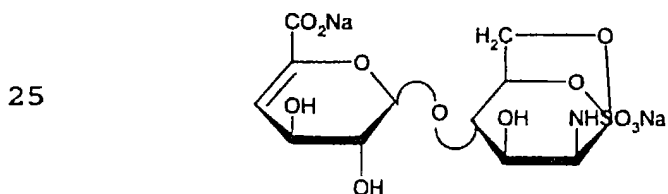
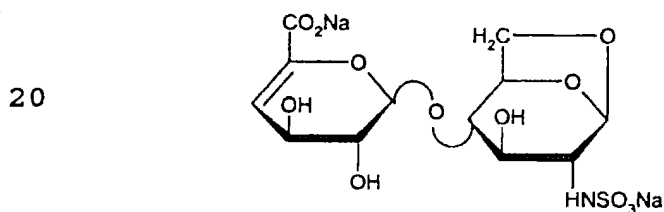
9) Méthode telle que définie à la revendication 6

5 caractérisée en ce qu'on utilise une méthode de détection permettant de détecter sélectivement les sucres acétylés.

10) Méthode telle que définie à la revendication 9

10 caractérisée en ce que la détection sélective des sucres acétylés s'effectue en prenant comme signal la différence entre l'absorbance à 2 longueurs d'onde choisies de telle manière que l'absorptivité des saccharides non acétylés s'annule.

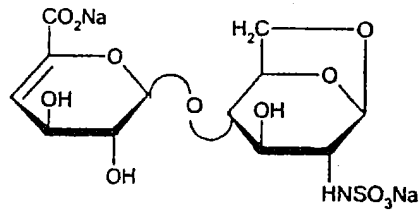
15 11) Méthode selon la revendication 1 caractérisée en ce que les résidus 1-6 anhydro obtenus lors de la réaction de dépolymérisation sont les suivants :



R

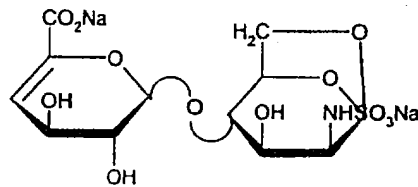
12) Dérivé 1, 6 anhydro de formule (disaccharide 1)

5



13) Dérivé 1,6 anhydro de formule (Disaccharide 2)

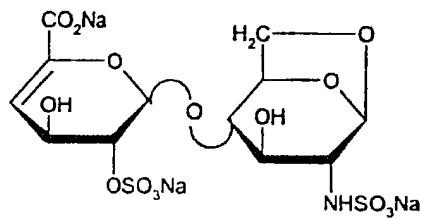
10



15

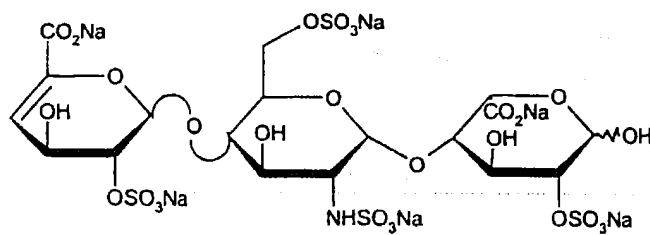
14) Dérivé 1,6 anhydro de formule (Disaccharide 3)

20



15) Dérivé trisaccharide de formule :

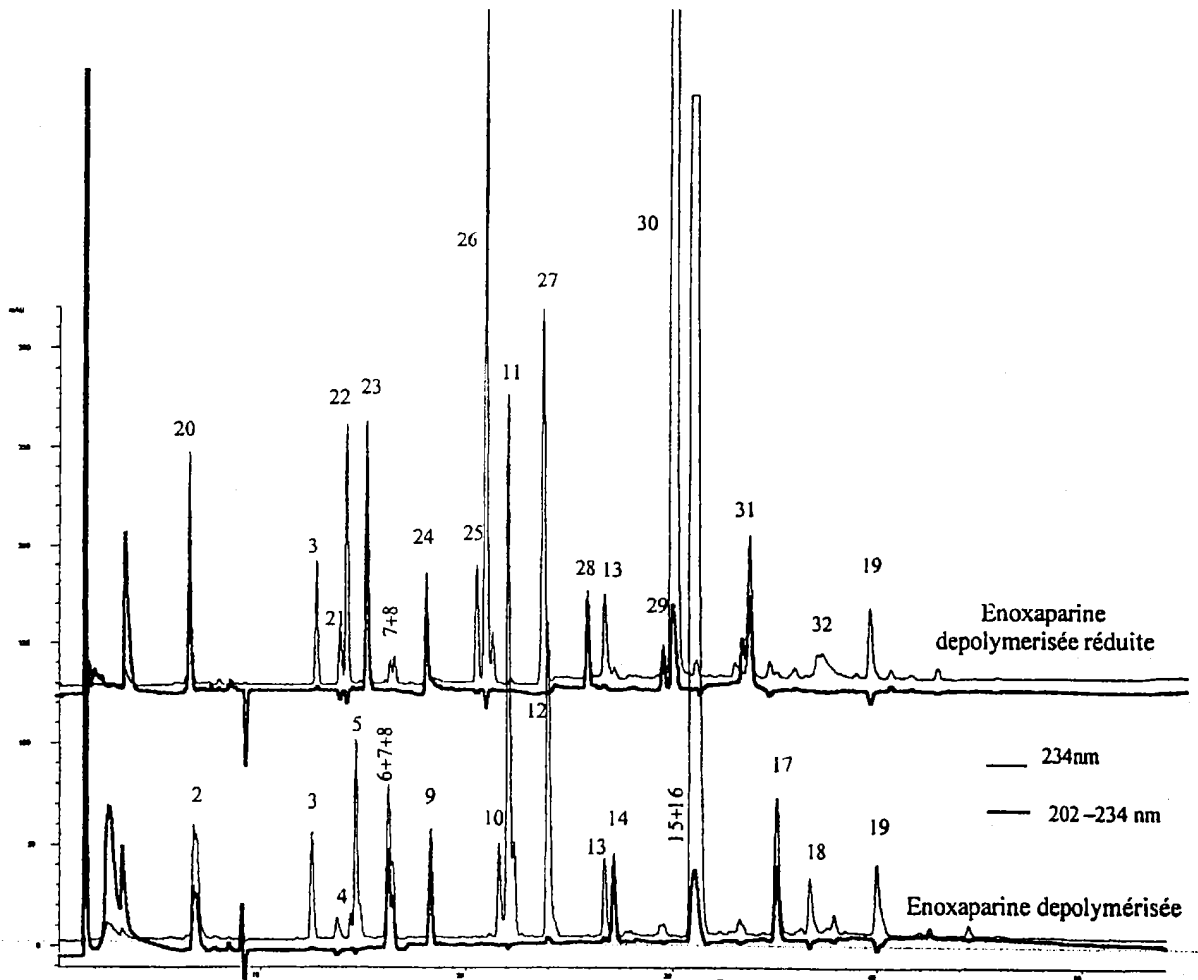
25



30

[Handwritten signature and stamp]

Figure 1



[Handwritten signature]

Figure 2

