

Héparines de synthèse

L'héparine est sans cesse plus utilisée pour prévenir et traiter les thromboses veineuses et/ou artérielles [1, 2]. Néanmoins son utilisation n'est pas dépourvue d'effets secondaires (d'origine immuno-allergique notamment) aux conséquences parfois graves. Au cours des trente dernières années, la recherche d'un médicament dérivé de l'hépa-

rine, dépourvu d'effets secondaires, a permis la découverte du mécanisme d'action de l'activité antithrombotique de cette classe de médicaments, puis l'obtention de molécules à la fois plus efficaces et mieux tolérées. Une préparation d'héparine standard est constituée d'un mélange de chaînes polysaccharidiques de structure complexe (figure 1), provenant

de la fragmentation d'un protéoglycane isolé de la muqueuse intestinale de porc. Ces chaînes portent de nombreux groupes chargés négativement (sulfates, carboxyles) qui leur confèrent la capacité d'interagir de manière plus ou moins spécifique avec un grand nombre de molécules biologiques [3]. L'identification, comme co-facteur de l'héparine [4],

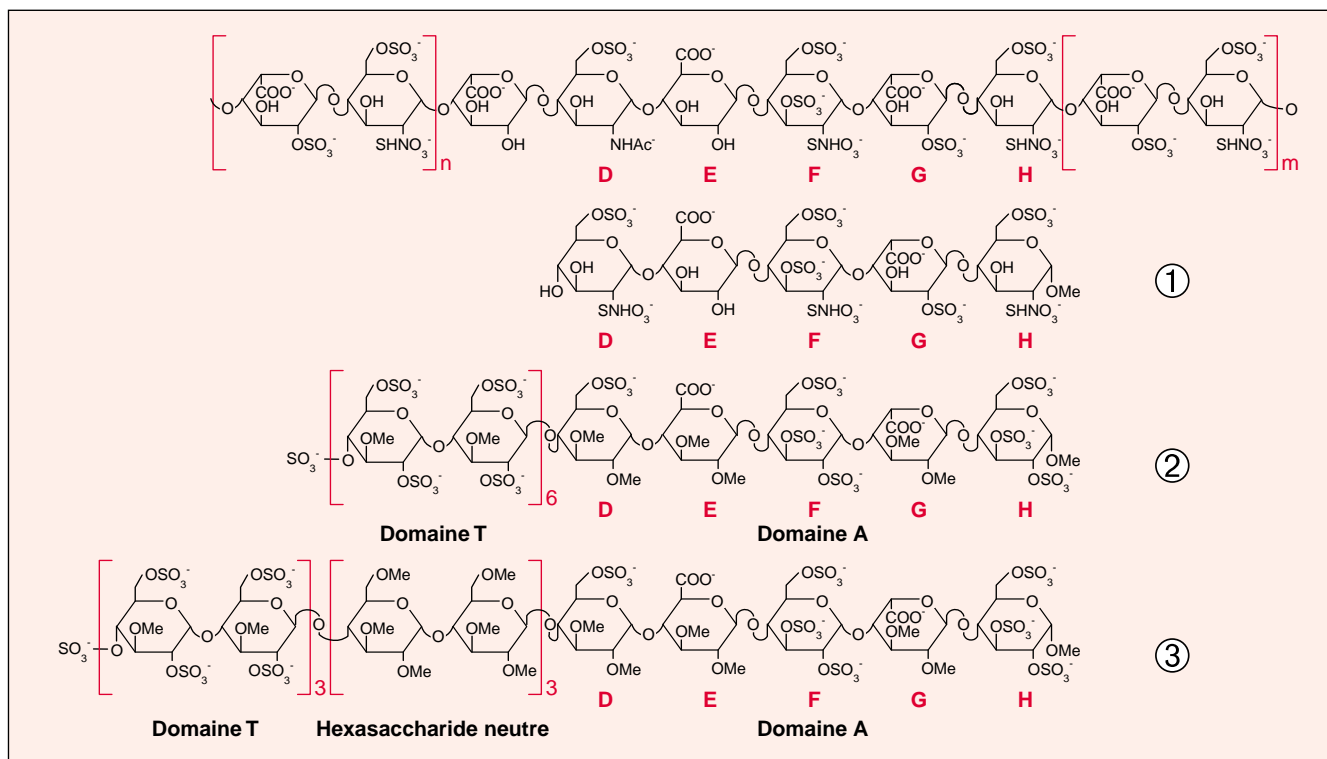


Figure 1. **Héparine et héparines de synthèse.** Dans une molécule d'héparine (ligne du haut), le disaccharide, entre crochets rouges, représente plus de 80 % de la structure (structure régulière) de la molécule. Cependant, des séquences particulières (structure irrégulière) telle que le trisaccharide DEF jouent un rôle essentiel dans les processus biologiques. Ainsi ce trisaccharide est-il l'élément clé du site de liaison pentasaccharidique DEFGH reconnu par l'antithrombine. Les mimes d'héparine 1-3 ont été obtenus par synthèse chimique. Le mime 1 reproduit le domaine de liaison à l'antithrombine (domaine A). Il catalyse l'inhibition sélective, par l'antithrombine, du facteur Xa. Le mime 2 comporte en outre un dodécasaccharide sulfaté qui constitue le domaine de liaison de la thrombine en plus du facteur Xa. Dans le mime 3 le domaine T a été réduit à un hexasaccharide sulfaté. Il est séparé du domaine A par un hexasaccharide neutre. Cette construction livre un composé possédant les mêmes propriétés anticoagulantes que 2 mais, à la différence de ce dernier, 3 n'est pas reconnu par le PF4 largué par les plaquettes.

de l'antithrombine, une glycoprotéine de la famille des inhibiteurs de sérine protéinases (SERPINS) puis, quelques années plus tard, la mise en évidence du rôle catalytique de l'héparine [5] ont été des événements majeurs dans la compréhension de son mécanisme d'action : l'antithrombine complexée à l'héparine subit un changement conformationnel et se fixe de façon irréversible sur le site actif des facteurs de coagulation (inhibiteur suicide) tandis que l'héparine est libérée intacte, jouant ainsi le rôle de catalyseur.

Les héparines de faible masse moléculaire

L'utilisation, à partir des années 1970, de « l'héparine à faible dose » a permis de démontrer que les doses initialement utilisées en clinique pouvaient être réduites de façon très significative sans que l'effet antithrombotique ne soit altéré. Ainsi naquit l'hypothèse [6] que, puisque la coagulation résulte d'une cascade de réactions enzymatiques (figure 2), l'inhiber en agissant au niveau des réactions situées en amont (par exemple en inhibant le facteur Xa plutôt que la thrombine), pouvait être plus efficace. Il est intéressant de noter que, pratiquement au même moment, fut révélée l'influence de la masse moléculaire des chaînes poly-

saccharidiques sur les propriétés anticoagulantes de l'héparine [7] : l'activité antifacteur Xa est indépendante de la masse moléculaire, alors que l'activité inhibitrice de la thrombine requiert une chaîne comprenant au minimum 14 à 20 unités monosaccharidiques. Ces deux découvertes pratiquement simultanées allaient conduire au développement de la classe des héparines de faible masse moléculaire (HBPM) qui constituent la majeure partie des héparines utilisées aujourd'hui. Les HBPM, obtenues par fragmentation des chaînes d'héparine, catalysent l'inhibition du facteur Xa et, de façon moindre, de la thrombine. Elles possèdent un effet antithrombotique pratiquement identique à celui de l'héparine. Du fait de leur masse moléculaire plus faible, elles sont moins promptes à interagir avec d'autres constituants du sang, ce qui leur confère un profil pharmacocinétique plus favorable ainsi qu'une meilleure tolérance.

Le passage au niveau moléculaire

L'identification d'une séquence pentasaccharidique particulière, responsable de la fixation et de l'activation de l'antithrombine [8-10] (DEFGH, figure 1) a constitué une étape décisive des recherches sur l'héparine. Cette découverte a entraîné un changement radical de la vision de l'inter-

action avec l'antithrombine et a permis de proposer un mécanisme moléculaire de son effet anticoagulant, le différenciant ainsi radicalement des autres effets : l'activité anticoagulante, source de l'activité antithrombotique, est liée à l'interaction spécifique avec l'antithrombine. Les effets secondaires, au contraire, sont liés à des interactions non spécifiques gouvernées par le caractère polyanionique du polysaccharide et sont donc directement corrélés à la densité de charge et à la taille des molécules. Selon ces conceptions, il semblait donc possible d'obtenir un antithrombotique mieux toléré en restreignant la structure des molécules au minimum nécessaire pour activer l'antithrombine vis-à-vis des facteurs de la coagulation. Ainsi, considérant que la survenue de thrombocytopenies induites par l'héparine (TIH) chez 3 % à 4 % des patients traités [11] est due à une interaction avec une protéine libérée par les plaquettes, le facteur plaquettaire 4 (PF4), on pouvait espérer obtenir, par synthèse chimique, des oligosaccharides possédant les propriétés anticoagulantes de l'héparine, mais incapables de se lier au PF4 et par conséquent de provoquer des TIH. La synthèse chimique permettrait en outre de s'affranchir de l'origine animale du polysaccharide, dont la disponibilité dépend actuellement de la source de matière première, la muqueuse intestinale de porc.

Synthèse d'inhibiteurs sélectifs du facteur Xa

Il découle du mécanisme d'activation de l'antithrombine par l'héparine (figure 2) qu'un pentasaccharide reproduisant le site de liaison à l'antithrombine est capable de catalyser l'inhibition par l'antithrombine du facteur Xa de la coagulation. Cela a été démontré par la synthèse de ce composé (Ⓞ, figure 1) et par l'étude de ses propriétés [12]. La synthèse a été extrapolée à l'échelle industrielle, et les études cliniques en cours permettront de savoir si l'inhibition sélective du facteur Xa selon ce mécanisme indirect se traduit effectivement par un effet antithrom-

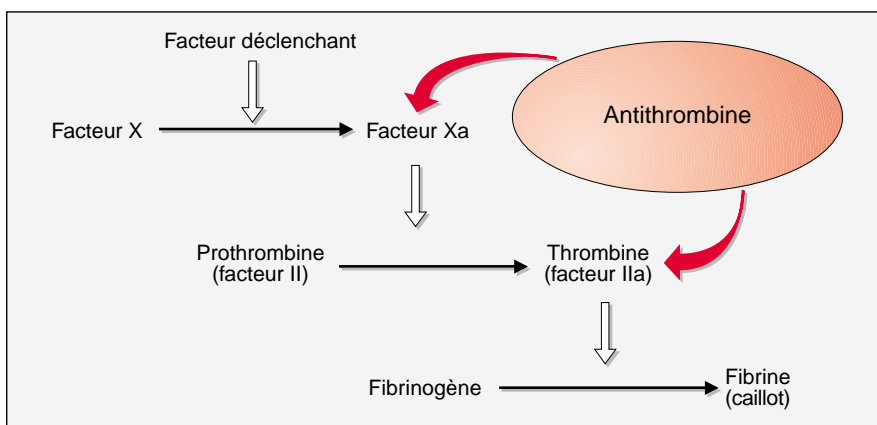


Figure 2. **Antithrombine et héparine.** Le système de la coagulation (très simplifié sur ce schéma) est maintenu en équilibre à l'aide d'inhibiteurs physiologiques parmi lesquels l'antithrombine qui joue un rôle régulateur fondamental. L'héparine se lie à l'antithrombine, induit un changement de conformation de cette protéine qui renforce la vitesse d'inhibition de la thrombine (x 4 000 fois) et du facteur Xa (x 500 fois).

Tableau I

ACTIVITÉ *IN VITRO* ET *IN VIVO* DES OLIGOSACCHARIDES 2, 3, ET DE L'HÉPARINE

Composé	2	3	héparine
Inhibition du facteur Xa (unités/mg)	270	270	180
Inhibition de la thrombine (IC50, ng/ml)	5,3	5,3	3,3
Neutralisation par le PF4 <i>in vitro</i>	Oui	Non	Oui
Activité antithrombotique (thrombose veineuse): ED 50 (µg/kg)	40	15	80
Activité antithrombotique (thrombose artérielle): ED 50 (µg/kg)	570	70	700

botique chez l'homme. La synthèse de variants de cette séquence pentasaccharidique, dont certains possèdent des durées de vie très allongées, a également été réalisée [13].

Des tests *in vitro* ont montré que l'activité anticoagulante des pentasaccharides n'est pas neutralisée par le PF4. De plus, ces produits, probablement du fait de leur petite taille et de leur charge réduite, sont inactifs dans les tests *in vitro* révélant la capacité de l'héparine d'induire des TIH, cela étant de bon augure pour leur tolérance chez l'homme.

Synthèse d'inhibiteurs du facteur Xa et de la thrombine

Nous avons ensuite recherché des molécules mimant plus précisément l'héparine, c'est-à-dire inhibant, par l'intermédiaire de l'antithrombine, à la fois le facteur Xa et la thrombine. Pour cela, le site pentasaccharidique de liaison à l'antithrombine a été prolongé par une séquence oligosaccharidique capable de fixer la thrombine (*figure 1*).

Alors que la fixation de l'héparine à l'antithrombine requiert la présence d'un site bien spécifique (*figure 1*), la thrombine est attirée de façon électrostatique par les charges négatives du polysaccharide. Cette attraction, non spécifique, est d'autant plus forte que la densité de charges négatives à la surface du squelette glucidique est élevée. Nous devons donc veiller à attirer efficacement la thrombine, sans cependant obtenir d'effet secondaire indésirable, en particulier pas de réaction positive

dans les tests TIH *in vitro*. La molécule que nous visions devait donc être capable de se lier à l'antithrombine et de l'activer, de se lier également à la thrombine, mais en revanche devait être incapable de se lier au PF4.

Dans un premier temps, au travers de la synthèse d'une série d'oligosaccharides, nous avons montré que pour inhiber la thrombine, un oligosaccharide doit posséder strictement plus de quatorze motifs d'hexopyranoses [14]. A partir de ce seuil, le pouvoir inhibiteur pour la thrombine augmente avec la taille de l'oligosaccharide, traduisant ainsi une augmentation de son aptitude à attirer de façon électrostatique la thrombine lorsque la taille s'accroît. La deuxième série de molécules synthétisées [15] comporte un site pentasaccharidique de haute affinité pour l'antithrombine, prolongé à l'extrémité non réductrice [16] par une série d'unités de glucose sulfatées destinées à reproduire de façon simple la densité et la répartition dans l'espace des charges des régions régulières des molécules d'héparine, régions qui constituent le domaine de liaison à la thrombine (*figure 1*). Compte tenu des résultats obtenus ci-dessus (longueur minimale requise pour observer une inhibition de la thrombine), nous avons préparé plusieurs composés dont un heptadécasaccharide (2, *figure 1*) qui s'est avéré être un puissant inhibiteur du facteur Xa et de la thrombine, ainsi qu'un agent antithrombotique particulièrement efficace (*Tableau I*). Néanmoins, alors que les propriétés de ces com-

posés étaient proches de celles de l'héparine, ils présentaient aussi la faculté d'être neutralisés par le PF4. Comme nous l'avons dit plus haut, cette dernière propriété étant rédhibitoire pour le développement de ces produits en tant que médicaments, nous avons ensuite réduit la charge des molécules [17, 18], le deuxième paramètre gouvernant les interactions de type électrostatique. Tenant compte du fait que le site d'interaction de l'héparine avec la thrombine est de la taille d'un tétra- ou d'un hexasaccharide, nous avons supprimé du composé 2 les charges de la partie centrale de la molécule qui n'interviennent ni dans la liaison avec l'antithrombine, ni dans celle avec la thrombine. Le composé 3 a donc été synthétisé. Ses propriétés biologiques figurent dans le *Tableau I*. Nous constatons, en comparant les propriétés de 2 et de 3, que cette modification a un effet relativement faible sur l'activité anticoagulante *in vitro* du produit, mais que, en revanche, elle lui permet d'échapper à la neutralisation par le PF4.

Cette approche nous a permis d'obtenir des produits qui possèdent une des plus puissantes activités antithrombotiques jamais rencontrée *in vivo* dans des modèles de thrombose veineuse et artérielle (*Tableau I*). Par ailleurs, ces produits ne présentent que peu d'effet hémorragique, un autre des effets secondaires de l'héparine, source de nombreux problèmes cliniques.

Ces travaux prouvent que des antithrombotiques possédant le mécanisme d'action de l'héparine mais dépourvus de ses effets secondaires peuvent être obtenus par synthèse chimique totale. L'étude clinique de ces composés est maintenant nécessaire pour confirmer leur intérêt thérapeutique ■

Maurice Petitou
Jean-Marc Herbert

Département cardiovasculaire-thrombose, Sanofi-Synthélabo Recherche, 195, route d'Espagne, 31036 Toulouse, France.

RÉFÉRENCES

1. Molho P, Tobelem G. L'héparine hier et aujourd'hui. *Med Sci* 1985; 1: 74-9
2. Lane DA, Lindahl U. In: *Heparin*. London: Edward Arnold, 1989.
3. Jaques LB. Heparins-anionic polyelectrolyte drugs. *Pharmacol Rev* 1979; 31: 99-167.
4. Abildgaard U. Highly purified antithrombin 3 with heparin cofactor activity prepared by disc electrophoresis. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 21: 89-91.
5. Rosenberg RD, Damus PS. The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *J Biol Chem* 1973; 248: 6490-505.
6. Wessler S, Yin ET. On the antithrombotic action of heparin. *Thromb Diathes Haemorrh* 1974; 32: 71-8.
7. Andersson LO, Barrowcliffe TW, Holmer E, Johnson EA, Sims GEC. Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matrix-bound antithrombin III and by gel filtration. *Thromb Res* 1976; 95: 75-83.
8. Lindahl U, Bäckström G, Thunberg L, Leder IG. Evidence for a 3-O-sulfated D-glucosamine residue in the antithrombin-binding sequence of heparin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 6551-5.
9. Choay J, Lormeau JC, Petitou M, Sinaÿ P, Fareed J. Structural studies on a biologically active hexasaccharide obtained from heparin. *Ann NY Acad Sci* 1981; 370: 644-9.
10. Thunberg L, Bäckström G, Lindahl U. Further characterization of the antithrombin-binding sequence in heparin. *Carbohydr Res* 1982; 100: 393-410.
11. Warkentin TE, Chong BH, Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia: towards consensus. *Thromb Haemost* 1998; 79: 1-7.
12. Choay J, Petitou M, Lormeau JC, Sinaÿ P, Casu B, Gatti G. Structure-activity relationship in heparin: a synthetic pentasaccharide with high affinity for antithrombin III and eliciting high anti-factor Xa activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 116: 492-9.
13. van Boeckel CAA and Petitou M. The unique antithrombin binding domain of heparin: a lead to new synthetic antithrombotics. *Angew Chem Int Ed Engl* 1993; 32: 1671-90.
14. Petitou M, Duchaussoy P, Driguez PA, *et al.* First synthetic carbohydrates with the full anticoagulant properties of heparin. *Angew Chem Int Ed Engl* 1998; 37: 3009-14.
15. Petitou M, Duchaussoy P, Driguez PA, Hérault JP, Lormeau JC, Herbert JM. New synthetic heparin mimetics able to inhibit thrombin and factor Xa. *Bioorg Med Chem Lett* 1999; 9: 1155-60.
16. Grootenhuis PDJ, Westerduin P, Meuleman D, Petitou M, van Boeckel CAA. Rational design of synthetic heparin analogues with tailor-made coagulation factor inhibitory activity. *Nat Struct Biol* 1995; 2: 736-9.
17. Petitou M, Duchaussoy P, Driguez PA, Hérault JP, Lormeau JC, Herbert JM. Synthetic oligosaccharides having various functional domains: potent and potentially safe heparin mimetics. *Bioorg Med Chem Lett* 1999; 9: 1161-6.
18. Petitou M, Hérault JP, Bernat A, *et al.* Synthesis of thrombin-inhibiting heparin mimetics without side effects. *Nature* 1999; 398: 417-22.

TIRÉS À PART

M. Petitou.