

ROYAUME DE BELGIQUE

BREVET D'INVENTION



MINISTRE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

NUMERO DE PUBLICATION : 1001075A3

NUMERO DE DEPOT : 8800497

Classif. Internat.: A61K

Date de délivrance : 27 Juin 1989

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la Convention de Paris du 20 Mars 1883 pour la Protection de la propriété industrielle;

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

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

Vu le procès verbal dressé le 03 Mai 1988 à 15h25
à l' Office de la Propriété Industrielle

ARRETE :

ARTICLE 1.- Il est délivré à : SOCIETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET
D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES (S.C.R.A.S.)
rue du Docteur Blanche 51/53, 75016 Paris(FRANCE)

représenté(e)s par : KUBORN Jacques, OFFICE HANSENS S.P.R.L., Square
Marie-Louise, 40 Bte 19 - 1040 BRUXELLES.

un brevet d' invention d' une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes
annuelles, pour : NOUVELLE COMPOSITION OPHTALMOLOGIQUE.

INVENTEUR(S) : Braquet Pierre, rue des Suisses 8, 92380 Garches (FR)

Priorité(s) 07.05.87 GB GBA 8710780

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

Bruxelles, le 27 Juin 1989
PAR DELEGATION SPECIALE :

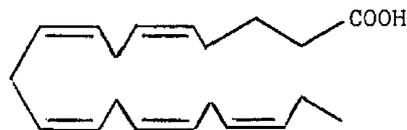

DIRECTEUR
@irecteur

Nouvelle composition ophtalmologique

DESCRIPTION

La présente invention concerne une nouvelle composition
5 ophtalmologique dont l'ingrédient actif est l'acide eicosa-
pentaénoïque.

L'expression "acide eicosapentaénoïque" (appelé ci-
après en abrégé "EPA") désigne l'acide cis-5,8,11,14,17-eicosa-
10 pentaénoïque répondant à la formule



L'EPA est un acide gras polyinsaturé connu provenant
15 de la chaîne alimentaire marine et servant de précurseur pour
les familles de la prostaglandine-3 et du thromboxane-3. Il
diffère de l'acide arachidonique par l'introduction d'une
double liaison supplémentaire entre les atomes de carbone en
positions 17 et 18.

L'invention fournit une composition ophtalmologique
20 comprenant une suspension d'EPA dans une alkyl-cellulose
et/ou une hydroxyalkylcellulose en solution aqueuse. L'EPA
est présent, de préférence, en une quantité de 0,5 à 3%,
mieux encore, à raison de 1%. La méthyl-cellulose et
25 l'hydroxypropyl-cellulose sont respectivement l'alkyl-
cellulose et l'hydroxyalkyl-cellulose préférées et la
solution de cellulose est, de préférence, une solution à 0,5%.

L'intérêt de la composition ophtalmologique suivant la présente invention est illustré par l'expérimentation suivante effectuée en utilisant des compositions ophtalmologiques contenant l'acide eicosapentaénoïque sur des yeux de lapins.

EXPERIMENTATION

On a effectué cette expérimentation sur des lapins chinchillas pigmentés mâles pesant 2,0-2,5 kg. Initialement, on a examiné tous les yeux avec une lampe à fente. Seuls les animaux ne présentant aucun signe d'inflammation oculaire ont été retenus pour l'étude. On a procédé à l'immunisation des lapins pigmentés par injection de 20 μ l d'albumine de sérum humain exempte de pyrogènes (HSA, solution à 20%) dans la cornée des deux yeux, suivant le procédé de Morawiecki, après anesthésie cornéenne avec de l'oxybuprocaine à 0,4% et sédation par "Hypnorm" (marque commerciale déposée; fluanison 10 mg/ml et citrate de phentanyle 0,2 mg/kg du poids du corps).

Les résultats ont été évalués en mesurant la formation d'œdème cornéen et en déterminant les acides gras présents dans les tissus cornéens.

a) Mesure de la formation d'œdème cornéen.

On a traité les yeux de lapins avec des suspensions d'acides gras préparées avec de l'hydroxypropyl-cellulose à 0,5% comme véhicule. On a préparé ces suspensions immédiatement avant l'application. Les témoins ont été traités uniquement avec le véhicule. On a commencé le traitement avec les préparations d'acides gras (une goutte oculaire de 30 μ l trois fois par jour, instillée dans le sac conjonctival) huit jours après l'immunisation et on a poursuivi le traitement pendant la durée des expériences. On a évalué la kératite des yeux de lapins en mesurant la formation d'œdème cornéen, la néovascularisation et l'apparition d'une infiltration leucocytaire annulaire dans la cornée (anneau de Wesseley). Ces trois paramètres de l'inflammation cornéenne peuvent être

très bien observés in vivo. L'observation clinique a été organisée suivant un mode à double masquage et, pour chaque animal, on a établi la moyenne des valeurs obtenues pour les deux yeux. On a évalué l'aspect de la cornée en comptant le nombre de jours au cours desquels des anneaux opaques ou une cornée diffuse complètement opaque étaient visibles, ainsi que le nombre de jours au cours desquels les vaisseaux étaient visibles dans la cornée.

Pour ces mesures, on a utilisé une lampe à fente "Haag-Streit" avec un pachymètre équipé de lampes à fixation centrale suivant Mishima et Hedbys. Pour chaque oeil, on a pris la moyenne de trois mesures.

On a mesuré l'épaisseur cornéenne centrale avant et aux 7e, 9e, 11e, 14e, 16e, 18e, 20e, 23e et 27e jours après l'injection intrastromale de HSA. Pour chaque animal, les différences entre les mesures pachymétriques avant et après l'injection intraoculaire de HSA ont été considérées comme de l'oedème (= Δ épaisseur cornéenne).

b) Détermination des acides gras présents dans les lipides du tissu cornéen après traitement topique avec l'acide eicosapentaénoïque ou l'acide colombinique.

On a donné, à trois groupes de quatre lapins ayant des yeux non enflammés, trois fois par jour, pendant quatre jours, une goutte oculaire de 30 μ l du véhicule (hydroxypropyl-méthyl cellulose à 0,5% dans de l'eau) ou d'une suspension d'acide colombinique à 3% ou d'acide eicosapentaénoïque à 1% dans le véhicule. On a tué les lapins en utilisant une dose excessive de penthotal, le cinquième jour, quatre heures après leur avoir donné une dernière dose (par voie topique) d'acide eicosapentaénoïque ou d'acide colombinique. En utilisant un trépan de 14 mm, on a disséqué les cornées de l'oeil énucléé intact. On a lavé quatre fois les cornées dans une solution salée pour empêcher la contamination, dans le procédé analytique, avec les acides gras appliqués par voie topique. Dans chacun des trois groupes d'animaux, on a

réuni séparément les yeux droits et gauches en vue de l'analyse des acides gras.

On a ajouté un volume de méthanol aux échantillons réunis et on les a conservés à -60°C jusqu'à l'analyse bio-
5 chimique. On a extrait les lipides des tissus cornéens avec un mélange 2:1 de chloroforme/méthanol.

On a concentré la couche de chloroforme avec un courant d'azote et on a transestérifié le résidu avec de l'acide
10 chlorhydrique méthanolique, pendant deux heures à 65°C .

Après extraction avec un mélange 50/50 d'hexane/éther
diéthylique et évaporation du solvant avec un courant d'azote,
on a soumis les esters d'acides gras à une chromatographie
sur des colonnes de silice avec un mélange 90:10 d'hexane/
15 éther diéthylique. On a soumis les esters méthyliques d'acides gras à une analyse par chromatographie gaz/liquide
après élimination du solvant avec un courant d'azote. On
a utilisé un chromatographe gazeux HP 5880 équipé d'un
préleveur automatique (7672 A, Hewlett-Packard) et d'un
20 détecteur FID en utilisant une colonne capillaire en verre WCOT (CP SIL 88, longueur = 25 cm, diamètre intérieur = 0,22);
température d'injection 225°C , détection à 350°C , programmation de 110 à 186°C à raison de $2^{\circ}\text{C}/\text{minute}$ et maintien
pendant 10 minutes à la température finale.

Analyse statistique

On a analysé les données par des procédés non paramé-
25 triques pour éviter les hypothèses à propos de la répartition des variables en cause. On a pratiqué l'essai de classement par rangs marqués d'un signe de Wilcoxon pour les données pachymétriques moyennes obtenues à différents moments dans les groupes trai-
30 tés et non traités au cours de la période d'inflammation et l'on s'est servi de l'essai U de Mann-Whitney pour l'analyse de la durée de la néovascularisation et de l'opacification cornéenne dans les yeux traités et non traités à n'importe quel moment
35 donné. La signification de la différence est indiquée pour deux observations se suivant de près,

les valeurs P inférieures à 0,05 étant considérées comme significatives.

RESULTATS

Yeux non traités

5 L'aspect de la kératite dans les yeux traités avec le véhicule était le suivant : Une semaine à dix jours après l'injection intracornéenne de HSA, l'opacification de la cornée a débuté au limbe et environ aux jours 14-17, est apparu un anneau blanc d'opacification connu sous le nom d'anneau de
10 Wesseley.

L'anneau est apparu pendant un à huit jours. Au cours d'un intervalle de deux à quatre jours, la vascularisation de la cornée a débuté à partir du limbe, elle s'est poursuivie à peu près jusqu'aux jours 22-25, puis elle a régressé
15 rapidement pour donner lieu, dans tous les cas, à une cornée claire, 30 jours après l'injection de HSA.

Tous les animaux ayant reçu une injection de HSA ont répondu par la formation d'un anneau blanc et une néovascularisation. La formation de l'oedème cornéen enregistrée par
20 pachymétrie a commencé aux environs du jour 7 et a duré jusqu'au jour 30.

Yeux traités avec des acides gras.

Chez des lapins traités avec EPA, l'acide colombinique, l'acide DHGL (= acide dihomog γ -linoléinique) et l'acide γ -
25 linoléinique, la période d'opacification cornéenne a été nettement plus courte comparativement aux témoins. La croissance des vaisseaux a été fortement diminuée après traitement avec l'EPA, l'acide colombinique et l'acide γ -linoléinique (tableau I). Ces substances, de même que l'acide DHGL ont également
30 inhibé de façon significative la formation d'oedème cornéen.

L'application topique d'acide arachidonique n'a ni accru, ni réduit la réponse inflammatoire (tableau I).

TABLEAU I
 OPACITE CORNEENNE, CROISSANCE DES VAISSEUX ET FORMATION D'OEDEME AU COURS DE LA KERATITE IMMUNOGENE

	Durée de l'opacité cornéenne (jours)	Durée de la néovasculari- sation cornéenne (jours)	Pachymétrie, zone sous la courbe (% comparativement aux témoins)
Témoins (n=16)	6,7 ± 0,5	7,2 ± 0,8	100 ± 13
Acide colombinique 3% (18:2 n-6 trans) (n=8)	3,7 ± 0,7 ***	3,7 ± 0,7 **	47 ± 10 ⁺⁺
Acide eicosapentaénoïque 1% (20:5 n-6) (n=8)	3,3 ± 0,5 ***	4,3 ± 0,8 *	60 ± 11 ⁺⁺
Acide dihomom-γ-linolénique 1% (20:3 n-6) (n=8)	3,9 ± 0,5 **	4,9 ± 0,9	70 ± 15 ⁺
Acide γ-linolénique 1% (18:3 n-6) (n=8)	4,6 ± 0,5 *	4,8 ± 0,6 **	71 ± 12 ⁺⁺
Acide arachidonique 1% (20:4 n-6) (n=8)	5,3 ± 1,0	6,4 ± 1,0	97 ± 21

* : moyenne ± erreur type de la moyenne

La signification de la différence vis-à-vis des témoins pour la durée de l'opacité cornéenne et de la croissance des vaisseaux a été calculée en adoptant l'essai U de Mann-Whitney

* p < 0,05 + p < 0,05

** p < 0,01 ++ p < 0,01

*** p < 0,002

Les valeurs pachymétriques moyennes des témoins et des animaux traités à différents moments au cours de l'inflammation ont été évaluées, en ce qui concerne leur signification, en adoptant l'essai de classement par rangs marqués d'un signe de Wilcoxon.

Acides gras présents dans les lipides du tissu cornéen après traitement topique avec l'acide eicosapentaénoïque ou l'acide colombinique.

5 Après un traitement topique de quatre jours, on a constaté, chez les animaux traités à l'EPA, l'apparition de 1,8% d'EPA (20:5 n-3) et de 2,5% de son métabolite 22:5 n-3 dans les phospholipides cornéens (voir tableau II).

10 Chez les animaux traités à l'acide colombinique, on a constaté l'apparition de 5,6% de cet acide gras dans les phospholipides cornéens.

Après traitement à la fois avec l'EPA et l'acide colombinique, la teneur en acide arachidonique (20:4 n-6) a diminué et, en outre, la métabolisation de l'acide arachidonique jusqu'à 22:4 n-6 a été partiellement inhibée (1,9%, respectivement 2,5%, 22:4 n-6) chez les animaux traités comparativement à 3% chez les animaux témoins. De même, la teneur en acide oléique (18:1) a diminué et la teneur en acide palmitique (16:0) a augmenté dans les phospholipides cornéens des animaux traités à l'EPA et à l'acide colombinique.

20 La quantité totale d'acides gras libres était de 4% de la quantité d'acides gras liés aux phospholipides. L'acide colombinique et l'EPA étaient présents dans la fraction d'acides gras libres, mais la teneur en acides gras de ce type était faible comparativement à la fraction liée aux phospholipides.

25 DISCUSSION

Les acides gras que sont l'acide colombinique, l'acide eicosapentaénoïque et l'acide γ -linoléinique, sont efficaces pour inhiber l'infiltration leucocytaire, la néovascularisation et la formation d'oedème cornéen. En ce qui concerne la néovascularisation et l'oedème cornéen, l'acide colombinique assure l'inhibition la plus efficace. L'acide eicosapentaénoïque est l'inhibiteur le plus efficace de l'infiltration leucocytaire. L'acide DHGL assure une importante inhibition de l'infiltration leucocytaire et de la formation d'oedème, mais non de la néovascularisation. Le traitement à l'acide arachidonique ne

30

35

08800497

8

produit ni une action inhibitrice, ni stimulante sur les paramètres de la kératite par complexes immuns.

TABLEAU II
 ACTION DE L'ADMINISTRATION TOPIQUE D'ACIDE COLOMBINIQUE (18:3 5,9,12) OU D'ACIDE EICOSAPENTAENOIQUE
 (20:5 n-3) SUR LA COMPOSITION DU TISSU CORNEEN DE LAPIN EN ACIDES GRAS LIBRES ET LIES AUX PHOSPHOLIPIDES
 ACIDES GRAS
 COMPOSITION DES ACIDES GRAS (POIDS)

Symbole numérique	Dénomination habituelle de l'acide gras	Témoins		Acide colombinique		Acide eicosapentaénoïque	
		PL	FFA	PL	FFA	PL	FFA
16:0	palmitique	10,9	0,7	13,8	0,4	15,8	0,7
18:0	stéarique	8,9	1,4	10,6	0,9	9,0	1,1
18:1 n-9	oléique	42,5	0,8	37,1	1,4	35,7	1,1
18:2 n-6	linoléique	0,9	0,0	0,7	0,1	0,5	0,0
18:3 5,9,12	colombinique	0,0	0,0	5,6	0,4	0,0	0,0
20:4 n-6	arachidonique	7,5	0,0	5,9	0,2	4,9	0,0
20:5 n-3	eicosapentaénoïque	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8	0,1
22:4 n-6		3,0	0,0	2,5	0,1	1,9	0,0
22:5 n-3		0,7	0,0	0,5	0,0	2,5	0,1
22:6 n-3	docosahexanoïque	0,3	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0

5 Les valeurs indiquées représentent la moyenne de deux préparations réunies de tissu cornéen, obtenues à partir de quatre animaux différents, extraites et analysées comme décrit dans le paragraphe "méthodes". Les chiffres indiquent les pourcentages des acides gras totaux. Le symbole numérique désigne la longueur de chaîne et le nombre de doubles liaisons de l'acide gras, n désignant l'emplacement de la première double liaison. (PL = acides gras liés aux phospholipides, FFA = acides gras libres).

Les animaux traités uniquement avec le véhicule ont répondu à 100% par une opacification cornéenne, une néovascularisation et un oedème. L'apparition d'anneaux opaques et de la néovascularisation dans la cornée concorde avec les observations antérieures en utilisant ce modèle d'anaphylaxie cornéenne.

5 PRESENTATION - POSOLOGIE

La présentation préférée comprend 0,5 à 1% en poids d'EPA dans une suspension aqueuse d'hydroxypropyl-cellulose/méthyl-cellulose. La posologie habituelle comprend trois 10 instillations par jour, pendant environ dix jours.

INDICATION

Il faut utiliser la composition suivant l'invention dans n'importe quel cas d'inflammation oculaire chez les êtres humains et/ou les animaux.

REVENDEICATIONS

1. Composition ophtalmologique comprenant une suspension d'acide eicosapentaénoïque dans une alkyl-cellulose et/ou une hydroxyalkyl-cellulose en solution aqueuse.
- 5 2. Composition ophtalmologique selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'acide eicosapentaénoïque est présent en une quantité de 0,5 à 3%.
3. Composition ophtalmologique selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que l'acide eicosapentaénoïque est présent en une
10 quantité de 1%.
4. Composition ophtalmologique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la solution de cellulose est une solution à 0,5%.
5. Composition ophtalmologique selon l'une quelconque des
15 revendications précédentes, caractérisée en ce que l'alkyl-cellulose est le méthyl-cellulose.
6. Composition ophtalmologique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'hydroxyalkyl-cellulose est l'hydroxypropyl-cellulose.



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE
établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numero de la demande
nationale

BE 8800497
BO 1201

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
X, Y	FR-A-2 426 461 (THE WELLCOME FOUNDATION) * Page 12, lignes 12-15; page 12, ligne 38 - page 13, ligne 4; page 13, ligne 36 - page 14, ligne 2; revendications 1,2,14 * ---	1-6	A 61 K 31/20 A 61 K 9/06 A 61 K 47/00
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 103, no. 15, 14 octobre 1985, page 160, résumé no. 117037d, Columbus, Ohio, US; P.S. KULKARNI et al.: "Prostaglandins E3 and D3 lower intraocular pressure", & INEST. OPHTHALMOL. VISUAL SCI. 1985, 26(8), 1178-82 * En entier * -----	2,3	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)
			A 61 K
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		24-11-1988	BERTÉ M.J.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

EPO FORM 1503 03.82 (P0448)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

BE 8800497
BO 1201

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 06/12/88
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A- 2426461	21-12-79	NL-A- 7904144	28-11-79
		BE-A- 876563	26-11-79
		DE-A- 2831507	29-11-79
		GB-A, B 2033745	29-05-80
		JP-A- 54154533	05-12-79
		AU-B- 527784	24-03-83
		SE-A- 7904570	27-11-79
		CA-A- 1151068	02-08-83
		CH-A- 644267	31-07-84
		AU-A- 3808478	17-01-80
		SE-B- 448678	16-03-87
		GB-A- 1604554	09-12-81
