



CONFÉDÉRATION SUISSE

OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑤ Int. Cl.³: A 61 K 37/18
A 61 K 35/12
C 07 G 7/00

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein

Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

⑫ **FASCICULE DU BREVET** A5⑪ **642 262**

⑪ Numéro de la demande: 1238/80

⑦ Titulaire(s):
Harry J. Robertson, Salisbury/MD (US)

⑫ Date de dépôt: 12.06.1978

⑦ Inventeur(s):
Harry J. Robertson, Salisbury/MD (US)

⑫ Brevet délivré le: 13.04.1984

⑦ Mandataire:
Kirker & Cie SA, Genève⑫ Fascicule du brevet
publié le: 13.04.1984

⑦ Demande internationale: PCT/US 78/00014 (En)

⑦ Publication internationale: WO 80/00059 (En)
24.01.1980⑤ **Procédé de préparation d'un hydrolysate de protéine.**

⑤ Un hydrolysate médical de protéine est produit à partir des pattes de jeunes volailles fraîchement tuées. La protéine ainsi produite est un extrait de polypeptides et d'acides-amino. Elle est sous la forme d'une poudre ou d'un gel, dont chacun convient pour l'application topique sur des cellules vivantes d'animaux et d'humains pour aider la guérison. Le procédé de production de l'hydrolysate de protéine comprend le traitement des pattes de volaille ou autre source de protéine, lavées et divisées en particules, avec un acide dilué, de préférence l'acide acétique, et le séchage de la solution résultante dans des conditions de faible chaleur jusqu'à obtention d'une poudre ou d'un gel. On peut utiliser l'hydrolysate de protéine par application topique périodique sur une région traumatisée (blessure). Au cas où le traitement doit être fait sous la surface, une solution aqueuse de la protéine peut être injectée dans la région à traiter.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de préparation d'un hydrolysate de protéine non antigène contenant un mélange de polypeptides et d'aminoacides, caractérisé en ce que l'on soumet des pattes de volaille non adulte à une hydrolyse acide douce.

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel on utilise des pattes de volaille non adulte dans lesquelles les anticorps ne sont pas entièrement développés.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que:

l'on divise en particules des pattes de volaille non adulte et on les lave,

l'on traite lesdites particules de volaille non adulte avec un acide organique faible dilué à un pH compris entre 6,5 et 3,6, à une température supérieure à la température ordinaire, mais ne dépassant pas 69°C,

l'on sépare les constituants gras, et

l'on isole les matières dissoutes dans l'acide dilué.

4. Procédé selon la revendication 3, dans lequel ladite température est comprise entre 54 et 60°C.

5. Procédé selon la revendication 3, dans lequel lesdites pattes de volaille proviennent de poulets âgés de pas plus de neuf semaines.

6. Procédé selon la revendication 3, dans lequel ledit acide organique faible est l'acide acétique.

7. Procédé selon la revendication 3, dans lequel, dans l'étape consistant à diviser en particules les pattes de volaille non adulte et à les laver, on broie les pattes des volailles et on les prétraite avec une solution d'acide organique faible contenant de 1 à 1,5% en poids d'acide entre 21 et 32°C pendant 8 à 12 h, prétraitement après lequel on lave les pattes de volaille à l'eau.

8. Procédé selon la revendication 3, dans lequel l'étape de séparation des constituants gras comprend le refroidissement de la solution et la séparation de la couche de graisse.

9. Procédé selon la revendication 8, dans lequel on obtient un gel déshydraté par réchauffage de la solution refroidie et séchage à l'air de la solution réchauffée.

10. Procédé selon la revendication 3, dans lequel on obtient une poudre par séchage par pulvérisation de la solution dont la matière grasse a été éliminée.

11. Procédé selon la revendication 3, dans lequel on décante la solution acide résultante.

12. Procédé selon la revendication 3, dans lequel on filtre la solution acide résultante à travers de la terre de diatomées.

On a supposé qu'il devait y avoir un produit qui créerait, dans une région traumatisée (blessée), des conditions aussi proches que possible de celles de l'environnement fœtal, en sorte que les cellules individuelles dans cette région pourraient avoir les meilleures chances de régénération. Comme, dans le complexe embryon/fœtal, les cellules, qui se divisent rapidement, proviennent d'une seule cellule fécondée, puis se divisent en tissus spécialisés, que ce soit du muscle, du nerf, de la peau, etc., on a cherché une source de protéine qui soit aisément accessible et peu coûteuse, provenant de pattes de volaille non adulte dans laquelle les anticorps ne sont pas bien développés. Comme les sous-produits de volaille sont aisément accessibles, on a pensé que ce serait une source idéale.

En ce qui concerne l'état de la technique, on est en mesure de citer les brevets US Nos 3400199, 3478146, 3526697, 4094973 et 2937974, le brevet GB N° 1520819, le brevet JP N° 52-154508 et le brevet CA N° 576039.

Le procédé de l'invention est défini dans la revendication 1 ci-dessus. Il fournit un hydrolysate de protéine considéré comme possédant les propriétés recherchées.

L'hydrolysate de protéine comprend les polypeptides solubles et les aminoacides solubles. Il est obtenu à partir de pattes de volailles

non adultes, telles que des pattes de poulets, par hydrolyse douce de la protéine animale au moyen d'un acide dilué, de préférence un acide organique faible tel que l'acide acétique, suivie de séchage ou de concentration de la solution résultante.

De préférence, le procédé comprend tout d'abord l'étape consistant à nettoyer la matière première, telle que les pattes de volailles à griller âgées de huit ou neuf semaines, puis à diviser cette matière première en petits morceaux et à la soumettre à un acide dilué, dans des conditions de pH et de température contrôlées. On décante la solution résultante, on la tamise ou on la filtre, puis on la sèche par pulvérisation ou on la déshydrate ou on la concentre d'une autre manière en une poudre sèche ou un gel séché.

En utilisation, la poudre est appliquée topiquement sur une blessure ouverte humide ou elle est reconstituée avec de l'eau et injectée, au moyen d'une seringue, dans la région à traiter. On utilise le gel pour le traitement de régions relativement sèches et on peut le reconstituer à partir de la poudre sèche ou à partir d'un gel partiellement séché.

On a utilisé de préférence les pattes de volailles à griller non adultes, fraîchement tuées, comme matière première et on en a extrait des polypeptides et des aminoacides qui sont dépourvus de propriétés antigènes.

A cet effet, on lave la matière première et on la divise en particules, puis on en dissout sélectivement les protéines avec aussi peu de dégradation biologique que possible, en utilisant un acide organique faible dilué, tel que l'acide acétique ou l'acide lactique, comme agent hydrolysant, complété par des températures d'extraction contrôlées. L'acide chlorhydrique et l'acide phosphorique ont été également essayés, avec moins de succès. L'acide acétique est de loin le meilleur acide à employer. La solution ainsi formée est un produit liquide, que l'on sèche, par pulvérisation ou par déshydratation, en un produit séché, qui peut être reconstitué en un gel.

Plus en détail, on utilise des pattes de jeunes poulets à griller, car elles contiennent suffisamment de protéine immature et sont économiques et abondantes. Après avoir soigneusement nettoyé les pattes dans de l'eau afin de les débarrasser des saletés, des débris et du sang, on broie les pattes à travers une plaque de 6,3 mm d'un broyeur Hobart. On peut utiliser des plaques allant de 3,2 à 12,7 mm; cependant une plaque de 6,3 mm paraît donner le broyage de finesse la plus efficace pour une extraction rapide et uniforme des protéines solubles.

Dans un récipient séparé, on prépare une solution d'acide acétique glacial dans de l'eau en ajoutant l'acide acétique glacial à l'eau pour produire une première solution diluée d'acide acétique contenant environ de 1 à 1,5% en poids d'acide acétique glacial. Dans cette solution diluée d'acide acétique, sur une base pondérale de 1 pour 1, on immerge les pattes broyées afin que l'acide puisse désagréger ou hydrolyser le sang et les autres matières étrangères, cela à la température ordinaire, c'est-à-dire à peu près entre 21 et 32°C. On laisse les particules de pattes et la solution diluée d'acide acétique travailler jusqu'au lendemain, c'est-à-dire pendant 8 à 12 h, en l'agitant périodiquement afin qu'elle soit bien mélangée. Ensuite, on lave ou balaie le mélange à l'eau fraîche jusqu'à ce que la masse de particules de pattes soit exempte de débris. Ce traitement initial ou prétraitement avec une solution d'acide acétique est destiné à éliminer le sang, les graisses libres et le sérum.

Ensuite, on prépare un autre mélange d'acide acétique glacial et d'eau de manière à obtenir une seconde solution ayant un pH de 4,6. Le pH peut varier de 6,5 à 3,6 si désiré. Cependant, on a observé que, lorsqu'on a utilisé ces limites extrêmes, la matière protéique résultante n'est pas aussi efficace. La masse de particules de pattes lavées est ensuite ajoutée à cette seconde solution en un rapport pondéral de 1 pour 1 et la masse résultante est chauffée jusqu'à une température de 54 à 60°C et est agitée continuellement pendant environ 30 à 40 min, mais elle peut être mélangée et chauffée pendant un plus court laps de temps, avec une baisse de rendement.

Ce mélange solubilisé est ensuite décanté ou soutiré, puis envoyé à travers une centrifugeuse pour éliminer la majeure partie de la

graisse et de la matière en particules. On fait ensuite passer la solution centrifugée, dégraissée, à travers un filtre. Jusqu'ici, on a constaté que le meilleur lit filtrant à utiliser est de la terre de diatomées Speed Flow, bien que l'on soit certain qu'il existe d'autres filtres qui seraient tout aussi efficaces.

Ensuite, on laisse la solution de protéine dissoute se solidifier, après quoi on écrème les graisses résiduelles. Pour solubiliser à nouveau cette protéine gélifiée, on la chauffe à nouveau à 38-49°C afin qu'elle puisse être pompée. Ce mélange (solution) d'acides aminés et de polypeptides contient généralement de 4 à 9% de solides. Si on veut en faire un gel, on sèche le solidifié (solution gélifiée) par séchage à l'air à basse température et on la reconstitue quand on en a besoin en amenant à nouveau l'eau solubilisante jusqu'à 38-49°C.

Si désiré, on procède à une autre (ou seconde) extraction, en utilisant la seconde solution d'acide acétique (pH 4,6) sur une base livre pour livre des pattes broyées précédemment extraites et de la solution d'acide acétique. On extrait pendant 30 min à 60-68°C et on mélange ce mélange avec l'autre solution de protéine filtrée et clarifiée, après avoir procédé aux mêmes opérations de dégraissage et de clarification que pour la première extraction. On n'a pas trouvé que ce second produit soit aussi bon que la première extraction, car on pense qu'il y a trop de dénaturation des protéines dans ce produit.

Pour produire la poudre sèche, la solution résultante est séchée par pulvérisation. La poudre a une grosseur moyenne de particule allant d'environ 1 à environ 20 µ.

La même méthode a été suivie avec une solution d'acide lactique, également diluée jusqu'à ce que le pH soit d'environ 4,6. La poudre résultante était efficace, mais à un moindre degré que celle produite avec de l'acide acétique. Comme il est usuel, d'autres acides organiques faibles pourraient être employés avec des résultats similaires. Il en a été de même lorsque les acides chlorhydrique et phosphorique ont été employés.

Les exemples suivants donneront une meilleure compréhension de la présente invention.

Exemple 1:

45 kg de pattes de volaille congelées provenant de poulets du commerce fraîchement tués, âgés de huit à neuf semaines, élevés et traités dans l'Etat du Maryland, U.S.A., ont été lavés à l'eau pour éliminer les débris grossiers, la saleté et le sang. Ils ont été ensuite broyés dans un broyeur Hobart muni d'une plaque de 6,3 mm, et cette matière en particules a été immergée dans 45 kg d'une solution aqueuse d'acide acétique glacial à 1% pendant 10 h à la température ambiante. Le mélange a été agité au moins une fois par heure pour exposer un maximum de surface à l'acide acétique dilué.

Ensuite, la solution a été séparée des pattes broyées en la versant sur un tamis de 0,8 mm. La matière restant sur le tamis a été ensuite lavée à l'eau jusqu'à ce que l'eau de lavage soit limpide. Cela a fourni 39,5 kg de pattes de volaille broyées, en particules, nettoyées.

Une première extraction a été effectuée en mélangeant de l'acide acétique glacial et de l'eau pour produire une solution contenant environ 1% en poids d'acide acétique glacial.

A 39,5 kg de la première solution d'extraction, on a ajouté les 39,5 kg de particules de pattes de volaille nettoyées. Le pH du mélange a été ensuite ajusté à 4,6 par addition d'acide acétique glacial. Ce mélange a été ensuite agité continuellement et porté à une température d'environ 54°C et maintenu entre environ 54 et 60°C pendant environ ½ h afin de dissoudre la protéine soluble provenant de la matière broyée.

Ce mélange solubilisé chaud a été ensuite passé à travers une centrifugeuse à lait en sorte que la graisse a été séparée de la solution et les solides, ou matière non solubilisée, en ont été séparés.

Ensuite, la solution centrifugée a été filtrée par passage à travers de la terre de diatomées [Speed Flow, un produit Dow Chemical (Grefco)]. A ce stade, la solution était une solution limpide contenant approximativement 2,6 kg du mélange de polypeptides et d'acides aminés.

Alors qu'elle était encore dans son état liquide, la solution limpide, à une température d'environ 38 à 49°C, a été passée à travers un séchoir par pulvérisation. La température d'entrée de l'air était d'environ 121°C et la température de sortie d'environ 49°C. La poudre d'hydrolysate de protéine non antigène qui en est résultée, étant hygroscopique, a été ensuite immédiatement placée dans un récipient hermétique, imperméable à l'humidité, afin qu'elle ne s'agglomère pas.

La poudre obtenue a donné l'analyse suivante:

pH	4,6
eau	7,9
N total	15,73
cendres	6,10

DISTRIBUTION DES AMINOACIDES

acide aspartique	5,51
acide glutamique	10,24
histidine	0,81
lysine	3,80
arginine	8,01
hydroxylysine	1,19
hydroxyproline	10,14
thréonine	2,26
sérine	2,86
tyrosine	0,73
glycine	23,41
½-cystine	0,32
proline	11,83
alanine	9,14
valine	2,43
méthionine	1,24
leucine	3,00
isoleucine	1,76
phénylalanine	2,23

Exemple 2:

La méthode de l'exemple 1 a été répétée mais, au lieu d'être séchée par pulvérisation, la solution filtrée a été séchée à l'air sec à une température de 18 à 24°C jusqu'à ce qu'elle contienne environ 5% d'humidité en poids.

L'hydrolysate de protéine obtenu pesait 2,76 kg et a été placé dans un récipient hermétique, imperméable à l'humidité.

La matière a été ultérieurement mélangée avec de l'eau pour produire divers échantillons de gels contenant environ 15 à 30% en poids de la matière. L'eau a été préchauffée entre environ 49 et 54°C et la matière ajoutée à l'eau chaude. Les gels ont été conservés sous réfrigération.

Dans les exemples 1 et 2, une centrifugeuse ou séparateur de crème Sharpless avec des pièces fixes a été utilisée. Un séchoir par pulvérisation Bowen a été utilisé dans l'exemple 1.

Dans la préparation de l'hydrolysate de protéine décrit ci-dessus, c'est-à-dire par extraction des polypeptides et des acides aminés au moyen d'acide acétique comme solvant pour les protéines extraites, les protéines sont dégradées à partir de leurs structures protéiques complexes jusqu'aux structures plus simples. Pour les meilleurs résultats, il est important que les solides, c'est-à-dire les matières minérales qui précipitent lorsque la protéine hydrolysée filtrée est déshydratée et refroidie, soient retenus dans le produit résultant. En l'absence de ces matières minérales, l'hydrolysate de protéine, bien que causant une excellente réparation d'une blessure, pourrait provoquer une hyperplasie concomitante qui devrait être débridée pour l'aligner sur le tissu adjacent. Ensuite, la blessure continuera lentement à se réparer.

En d'autres termes, on a constaté qu'il n'est pas désirable d'éliminer les matières minérales qui ont précipité pendant que les protéines extraites (solubilisées) perdent leur humidité, et qu'il n'est pas désirable de filtrer le produit après qu'il est sous forme concentrée. Lorsque les mélanges non précipités des exemples 1 et 2 ont été utilisés, l'hyperplasie du tissu régénérant a disparu, et non seulement le

tissu musculaire, mais également le tissu cutané et le tissu nerveux se sont régénérés et ont récupéré leur position, leur configuration et leur fonction normales, ce qui indique que les tissus ont retrouvé leur mémoire.

Traitement au moyen de l'hydrolysât médical de protéine

L'hydrolysât de protéine est particulièrement utile pour le traitement des brûlures, en particulier des brûlures du troisième degré. La poudre sèche est saupoudrée sur la région affectée et se combine avec l'humidité présente dans le tissu pour former un revêtement protecteur stimulant les cellules. Le gel est utilisé de préférence pour les brûlures du premier et du second degré où l'on rencontre une zone relativement sèche. La douleur est ordinairement stoppée en 3 à 5 min après l'application sur la zone affectée. On a constaté qu'il est préférable d'appliquer une couche saupoudrée de poudre sèche ou de gel sur la zone brûlée environ chaque troisième jour.

Dans le cas des brûlures du troisième degré, la poudre permet aux fibroblastes ou cellules régénératrices de continuer à proliférer à partir du centre et des bords de la blessure, si bien que la greffe de peau est sensiblement réduite ou entièrement éliminée. En outre, la nouvelle peau paraît même être formée de cellules normales, et des poils poussent même sur la nouvelle peau de manière normale.

Dans la plupart des cas de blessures d'animaux traitées avec cette matière, séchée par pulvérisation ou sous forme de gel, les infections bactériennes ont généralement été éliminées après les trois premiers jours et, dans tous les cas, l'infection a paru être éliminée à la fin du septième jour (fin de la seconde application). Cela a été démontré sur des blessures disruptives massives avec gangrène gazeuse (cliniquement), dues à des disruptions traumatiques et autres de la peau et des tissus musculaires, nerveux et vasculaires sous-jacents.

Par utilisation de cette matière en application topique, sous forme de poudre séchée par pulvérisation ou sous forme de gel, l'hyperplasie du tissu régénérant a disparu, et non seulement le tissu musculaire, mais également les tissus cutané et nerveux se sont régénérés de façon remarquable et ont récupéré leur position, leur configuration et leur fonction normales, ce qui indique que cette matière a rendu la mémoire aux tissus.

Les décutibus qui ont existé pendant un certain temps ont bien guéri après traitement avec cette matière. En effet, même les cellules qui paraissaient être mortes autour d'une blessure sont redevenues normales.

Essai comparatif

Pour démontrer l'importance de l'utilisation d'un tissu d'animal non adulte, et en particulier des pattes de volailles non adultes, l'essai suivant a été effectué. Quatre chats de mêmes poids, maturité

et état de santé, ont été opérés, et trois muscles de la cuisse supérieure droite ont été coupés: les muscles *Biceps femoris*, *Vastus lateralis* et *Semitendinosus*. Chaque chat a été traité avec un agent appliqué topiquement pour couvrir la blessure deux fois par semaine jusqu'à ce que toutes les blessures aient guéri.

Le premier chat a été traité avec l'hydrolysât de protéine préparé suivant l'exemple 2 ci-dessus. Ses blessures ont guéri en 21 d sans complications. Il a marché sans boiter au bout de 7 d.

Un deuxième chat a été traité avec un hydrolysât de protéine préparé de manière identique à partir de pattes de poulets âgés d'environ une année. La guérison a pris 33 d et une hyperplasie s'est développée le huitième jour. La marche normale est apparue seulement le quinzième jour.

Un troisième chat a été traité avec un hydrolysât de protéine de la technique antérieure, de la caséine hydrolysée, un produit Borden. Il a développé une hyperplasie le septième jour et une infection secondaire, qui ont persisté toutes deux jusqu'à la guérison finale au bout de 33 d. Ce chat a boité jusqu'à la guérison finale.

Le quatrième chat a été traité avec l'antibiotique à large spectre 5-nitro-2-furaldéhyde semi-carbazone (Furacin, un produit de Eaton Laboratories). La guérison a pris 33 d. Une moindre quantité d'hyperplasie a été notée et le chat a marché en boitant pendant toute la période.

Le troisième et le quatrième chat ont également présenté une atrophie progressive des muscles postérieurement à l'incision, atrophie qui s'est poursuivie jusqu'à ce que le fémur puisse être palpé.

Cet essai démontre l'efficacité et les avantages de l'hydrolysât de protéine préparé conformément à la présente invention et en particulier la vitesse de récupération, l'absence d'infection, l'absence d'hyperplasie et le retour complet de la fonction musculaire.

On voit donc que l'agent thérapeutique de la présente invention, c'est-à-dire l'hydrolysât médical de protéine, est un mélange hygroscopique de polypeptides et d'acides aminés. Il paraît avoir l'aptitude remarquable de créer, autour d'une région blessée, des conditions permettant une véritable régénération tissulaire, cela en l'absence totale d'anticorps, même dans les blessures les plus gravement infectées.

De préférence, la blessure est abondamment couverte avec la poudre ou le gel. Lorsque la poudre est utilisée, la surface doit être humide afin que la poudre puisse coller. Aucune réaction tissulaire nuisible n'a été observée dans aucun traitement au moyen de l'hydrolysât de protéine.

Il est désirable de couvrir la blessure avec un pansement non adhérent (Telfa) pour maintenir la poudre/gel en contact avec la blessure. Le traitement de la blessure avec cette matière devrait être répété tous les 3 ou 4 d.