

**(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 février 2002 (07.02.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/09740 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

A61K 38/40

DE, DK, DM, DZ, EC, EE, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Date de dépôt international : 27 juillet 2001 (27.07.2001)

(84) États désignés (regional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

00/09883 27 juillet 2000 (27.07.2000) FR

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

- relative au droit du déposant de revendiquer la priorité de la demande antérieure (règle 4.17.iii)) pour toutes les désignations

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
ISOCELL S.A. [FR/FR]; 18, rue Angélique Verien, F-92200 Neuilly-sur-Seine (FR).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

(71) Déposant et

(72) Inventeur : **DUGAS, Bernard** [FR/FR]; 4 square des Muses, F-91370 Verrières le Buisson (FR).

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.

(74) Mandataires : ORES, Béatrice etc.; Cabinet Ores, 6, Avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,



(54) Title: COMPOSITION CONTAINING AN IRON COMPLEXING PROTEIN AND A PRECURSOR OF NITROGEN MONOXIDE METABOLISM AND/OR A CHEMICAL DONOR OF NITROGEN MONOXIDE AND USES THEREOF

(54) Titre : COMPOSITION CONTENANT UNE PROTEINE COMPLEXANT LE FER ET UN PRECURSEUR DU METABOLISME DU MONOXYDE D'AZOTE ET/OU UN donneur chimique de monoxyde d'azote et utilisations

WO 02/09740 A1

(57) Abstract: The invention concerns a pharmaceutical composition or a food supplement containing at least an iron complexing protein optionally in the presence of at least an iron salt, and at least a precursor of nitrogen monoxide metabolism and/or at least a chemical donor of nitrogen monoxide, the use of at least an iron complexing agent and of at least a precursor of nitrogen monoxide metabolism and/or a chemical donor of nitrogen monoxide, and optionally at least an iron salt for making pharmaceutical compositions in particular for treating asthenia or anaemia or for making a food supplement.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet une composition pharmaceutique ou complément nutritionnel contenant au moins une protéine complexant le fer éventuellement en présence d'au moins un sel de fer, et au moins un précurseur du métabolisme du monoxyde d'azote et/ou au moins un donneur chimique de monoxyde d'azote ; l'utilisation d'au moins une protéine complexant le fer et d'au moins un précurseur du métabolisme du monoxyde d'azote et/ou d'au moins un donneur chimique de monoxyde d'azote, et éventuellement d'au moins un sel de fer pour la fabrication de compositions pharmaceutiques destinées notamment au traitement de l'asthénie ou de l'anémie ou pour la fabrication d'un complément nutritionnel.

COMPOSITION CONTENANT UNE PROTÉINE COMPLEXANT LE FER ET UN PRÉCURSEUR DU MÉTABOLISME DU MONOXYDE D'AZOTE ET/OU UN DONNEUR CHIMIQUE DE MONOXYDE D'AZOTE ET UTILISATIONS

5 La présente invention est relative à une composition pharmaceutique ou complément nutritionnel contenant au moins une protéine complexant le fer, et au moins un précurseur du métabolisme du monoxyde d'azote, ainsi qu'à l'utilisation d'au moins une protéine complexant le fer et d'au moins un précurseur du métabolisme du NO pour la fabrication de compositions pharmaceutiques destinées notamment au 10 traitement de l'asthénie et/ou de l'anémie ou pour la fabrication d'un complément nutritionnel.

Les protéines capables de complexer le fer, telles que la lactoferrine (Lf) et la transferrine (Tf) ont de nombreuses propriétés biologiques.

Il a ainsi été démontré tout d'abord (Griffiths E. *et al.*, 1977, *Infection & Immunity*, **15** (2), 396-401) que la Lf humaine présentait une activité bactéricide.

La Lf humaine est retrouvée dans la plupart des sécrétions biologiques externes, telles que les sécrétions bronchiques, salivaires, lacrymales, nasales, gastriques, pancréatiques, duodénales, vaginales, ainsi que dans différents liquides biologiques tels que les liquides synoviale et amniotique, et enfin dans le 20 plasma. La Lf est retrouvée dans le colostrum et le lait de la plupart des mammifères. Les concentrations de Lf dans le lait varient selon l'espèce considérée et la maturité du lait. Des études récentes, réalisées après le clonage de la Lf bovine, démontrent que la Lf bovine présente une identité de séquence protéique de 69 % (Pierce *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 1991, **196**, 177-184).

En fait, il apparaît que la Lf bovine présente d'autres fonctions biologiques importantes autres que son activité bactéricide et que celles-ci sont plus importantes que celles de la Lf humaine. En effet, il a été démontré que la Lf bovine présentait des propriétés immunorégulatrices et antioxydantes (Paul-Eugène *et al.*, Compte-rendu de l'Académie des Sciences françaises, 1993, **316**, 113-119). Ces 30 observations démontrent clairement que ce type de protéines, en plus de son activité protectrice vis-à-vis des infections bactériennes, pouvait présenter un certain nombre

de propriétés immuno-stimulantes et anti-oxydantes bénéfiques pour l'organisme, soit en régulant l'immunité naturelle, soit en stimulant l'hématopoïèse. Ces propriétés sont dues à la présence de récepteurs pour la Lf à la surface de plusieurs types de cellules, comme les entérocytes (Iyer et Lönnerdal, Eur. J. Clin. Nutr., 1993, 47,232-241), les 5 cellules phagocytaires (Birgens H. S., 1991, Danish Medical Bulletin, 38 (3), 244-252) et les lymphocytes (Bennet et Davis, J. Immunol., 1981, 127, 1211-1216 ; Birgens *et al.*, Br. J. Haematol., 1983, 54, 383-388).

La Lf est fortement représentée dans le lait de vache ou dans le colostrum (plusieurs mg/l). Ainsi, son utilisation sous forme semi-purifiée dans le 10 domaine du complément nutritionnel, et purifiée dans le domaine pharmaceutique est tout à fait envisageable, notamment pour assurer le transport et la fixation du fer au niveau cellulaire en particulier dans les cas de déficit en fer, pour stimuler l'hématopoïèse dans le cas de l'anémie, pour éliminer certains agents bactériens pathogènes présents notamment dans le tube digestif, comme complément fonctionnel 15 dans la lutte contre l'allergie et l'intolérance nutritionnelle ou bien encore en complémentation fonctionnelle de certains produits anti-oxydants tels que la superoxyde dismutase (SOD) par exemple.

Des études ont démontré l'importance de la Lf dans l'absorption intestinale du fer. En effet, le transport du fer dans les cellules épithéliales gastro-intestinales humaines (Caco-2) s'effectue préférentiellement à partir de la Lf humaine qui contient le fer sous forme complexée plutôt qu'à partir de fer sous forme libre tel que le sulfate ferreux (Cox T. M. *et al.*, 1979, Biochimica & Biophysica Acta, 558, 129-141).

Plusieurs mécanismes de mise à disposition du fer et de la Lf ont été 25 proposés : 1) le fer serait transporté au travers de l'entérocyte par la Lf supposée intacte (Mikogami T. *et al.*, 1994, American J. Physiol., 267, 308-315) ; 2) le fer serait libéré au niveau de la membrane plasmique (Roiron-Lagroux et Figarella, 1990, Biochimica & Biophysica Acta, 170, 837-842) ; 3) le fer serait libéré après adsorption de la Lf et sa dégradation lysosomiale, les produits de dégradation étant transportés par voie 30 transcellulaire (Sanchez *et al.*, 1996, Biochimica & Biophysica Acta, 1289, 291-297).

Des compositions pharmaceutiques contenant l'association de lactoprotéines telles que la lactoferrine et d'un sel de fer ont déjà été proposées, cependant ce type de composition bien qu'assurant le transport du fer au niveau cellulaire, n'y permet cependant pas sa fixation de façon durable.

5 Si le transport du fer par la Lf semble réalisable, la fixation durable du fer au niveau cellulaire reste un facteur crucial pour l'utilisation de ce type de produit dans le traitement de l'anémie notamment. Or jusqu'à ce jour, aucune composition pharmaceutique permettant à la fois le transport et la fixation du fer au niveau cellulaire n'a été proposée.

10 C'est afin de remédier à ce problème que les Inventeurs ont mis au point ce qui fait l'objet de l'invention.

La présente invention a donc pour objet une composition pharmaceutique ou un complément nutritionnel caractérisée par le fait qu'elle (ou qu'il) comprend à titre de principe actif :

15 - au moins une protéine complexant le fer, éventuellement en présence d'au moins un sel de fer, et

- au moins un précurseur du métabolisme du monoxyde d'azote (NO) et/ou au moins un donneur chimique de monoxyde d'azote ;

et éventuellement au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

20 Les Inventeurs ont en effet démontré que la fixation cellulaire durable du fer est fortement potentialisée en présence d'au moins un précurseur du métabolisme du NO et/ou en présence d'au moins un donneur chimique de monoxyde d'azote.

25 Parmi les protéines complexant le fer et pouvant être utilisées dans la composition pharmaceutique ou dans le complément nutritionnel conformes à la présente invention, on préfère utiliser de la lactoferrine (Lf) ou de la transferrine. L'utilisation de la Lf est particulièrement préférée.

30 La Lf peut être d'origine bovine, chevaline, caprine, ovine ou bien encore être obtenue par voie synthétique ou recombinante. Parmi les Lf recombinantes,

on peut notamment citer celles qui sont décrites dans les Demandes Internationales WO 97/45136 et WO 98/50543.

D'une manière générale, les protéines complexant le fer peuvent être utilisées sous forme native ou sous forme modifiée afin d'augmenter leur taux de saturation en fer.

A titre d'exemple, et lorsque la Lf est utilisée, celle-ci peut ainsi subir un traitement à pH acide en présence d'un sel de fer de façon à augmenter son taux de saturation en fer à des valeurs supérieures à 80 % environ, comparativement à la Lf à l'état naturel (Lf native) qui présente un taux de saturation en fer de l'ordre de 20 % environ.

Selon une forme de réalisation avantageuse de l'invention, on préfère utiliser une lactoferrine présentant un taux de saturation en fer supérieur à 50 % et encore plus préférentiellement supérieur à 80 %.

La ou les protéines complexant le fer sont de préférence utilisées à des doses unitaires comprises entre 0,01 mg et 5 mg environ, et encore plus préférentiellement entre 0,1 mg et 1 mg environ.

Parmi les sels de fer pouvant éventuellement être utilisés dans la composition pharmaceutique ou dans le complément nutritionnel conformes à l'invention, on peut notamment citer les sels les sels ferreux (sulfate, chlorure), les sels ferriques (chlorure, sulfate, phosphate), le fumarate de fer, l'oxalate de fer, l'ascorbate de fer, le gluconate de fer, le succinate de fer, l'acétate de fer, et le ferédétate.

Lorsqu'ils sont utilisés, le ou les sels de fer peuvent être présents au sein de la composition pharmaceutique ou au sein du complément nutritionnel conformes à l'invention soit sous forme non complexée, c'est-à-dire que le sel de fer n'est pas complexé à la protéine complexant le fer, soit sous forme partiellement complexée ou totalement complexée à la protéine complexant le fer.

Lorsqu'ils sont présents au sein de la composition pharmaceutique ou au sein du complément nutritionnel conformes à l'invention, le ou les sels de fer sont de préférence utilisés à des doses unitaires comprises entre 0,01 et 1 mg environ et encore plus préférentiellement entre 0,05 et 0,5 mg environ.

Parmi les précurseurs du métabolisme du NO, on peut citer la L-arginine et ses sels tels que le chlorhydrate de L-arginine, le glutamate de L-arginine, et l'aspartate de L-arginine ; les protéines et les peptides riches en L-arginine, c'est-à-dire constitués d'au moins 10 % en poids de L-arginine, et parmi 5 lesquels on peut citer notamment les protéines et les peptides issus d'extraits de lupin.

Parmi les donneurs chimiques de monoxyde d'azote, on peut citer la S-nitroso-N-acétyl-pénicillamine (SNAP).

Le ou les précurseurs du métabolisme du NO et/ou le ou les donneurs chimiques de NO sont de préférence utilisés à des doses unitaires comprises entre 10 0,001 mg et 1 mg environ et encore plus particulièrement entre 0,01 mg et 0,1 mg environ.

Lorsque de la L-arginine et/ou l'un de ses sels sont présents dans la composition pharmaceutique ou dans le complément nutritionnel conformes à l'invention, ils sont alors utilisés à des doses unitaires comprises de préférence entre 15 0,1 mg et 5 mg environ et encore plus particulièrement entre 0,5 et 2 mg environ.

Selon l'invention le rapport pondéral protéine(s) complexant le fer / précurseur(s) du métabolisme du NO et/ou donneur(s) chimique(s) de NO est de préférence compris entre 1/1 et 10/1.

Selon une forme de réalisation particulièrement préférée de 20 l'invention, le rapport protéine(s) complexant le fer / précurseur(s) du métabolisme du NO et/ou donneur(s) chimique(s) de NO est de 1/1 (poids pour poids).

Selon l'invention, on préfère une composition pharmaceutique ou un complément nutritionnel renfermant l'association de :

- de 0,01 mg à 5 mg de lactoferrine,
- 25 - de 0,01 à 1 mg d'un sel de fer, et
- de 0,1 mg à 5 mg de L-arginine.

Selon l'invention, on préfère encore plus particulièrement une composition pharmaceutique ou un complément nutritionnel renfermant l'association de :

- 30 - de 0,01 mg à 1 mg de lactoferrine,
- 0,1 mg d'un sel de fer, et

- 1 mg de L-arginine.

La composition pharmaceutique conforme à l'invention présente les propriétés de pouvoir être notamment utilisées pour stimuler l'hématopoïèse dans les cas d'anémie, et pour le traitement de l'asthénie. De plus, grâce aux propriétés biologiques intrinsèques des lactoferrines, la composition pharmaceutique conforme à l'invention, lorsqu'elle renferme de la lactoferrine à titre de protéine complexant le fer, peut également être utilisée pour l'élimination d'agents bactériens pathogènes (dans le tube digestif en particulier), comme complément fonctionnel dans la lutte contre l'allergie et l'intolérance nutritionnelle ou bien encore comme complément fonctionnel en association avec certains produits anti-oxydants tels que la SOD en particulier.

A ce titre, une composition pharmaceutique ou un complément nutritionnel conforme à l'invention, renfermant au moins une lactoferrine à titre de protéine complexant le fer et en outre de la SOD, est particulièrement préférée.

Le complément nutritionnel conforme à l'invention présente la propriété de pouvoir être utilisé pour prévenir les déficits en fer ou les risques de déficit en fer, notamment chez la femme enceinte.

La composition pharmaceutique conforme à l'invention peut également renfermer un ou plusieurs principes actifs additionnels tels que ceux habituellement utilisés dans les compositions pharmaceutiques destinées au traitement de l'asthénie et/ou de l'anémie, et parmi lesquels on peut notamment citer les vitamines telles que la vitamine B₁₂, l'acide folique (ou vitamine B_c), et l'acide ascorbique (ou vitamine C) ; le co-enzyme Q10.

Le véhicule pharmaceutiquement acceptable selon l'invention est de préférence constitué par un ou plusieurs excipients classiquement utilisés pour la préparation de compositions pharmaceutiques, tels que des anti-agglomérants, des anti-oxydants, des colorants, des agents modifiants du goût, des agents de lissage, de montage, d'isolation et de manière générale, tout excipient classiquement utilisé dans l'industrie pharmaceutique.

Bien entendu, l'homme de l'art veillera à cette occasion à ce que le ou les excipients éventuellement utilisés soient compatibles avec les propriétés intrinsèques attachées à la présente invention.

La composition pharmaceutique conforme à l'invention est de préférence administrée par voie orale à raison de une à deux prises par jour pendant 8 jours.

Elle peut se présenter sous diverses formes, telles que sous forme de comprimés, de gélules, de suspensions buvables, de tablettes ou sous toute autre forme appropriée au mode d'administration par voie orale,

Le complément nutritionnel conforme à l'invention est de préférence absorbé par voie orale et peut se présenter sous diverses formes, telles que de comprimés, de gélules, de suspensions buvables, de tablettes ou sous toute autre forme appropriée à la présentation habituelle d'un complément nutritionnel.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'au moins une protéine complexant le fer et d'au moins un précurseur du métabolisme du NO et/ou d'au moins un donneur chimique de monoxyde d'azote, et éventuellement d'au moins un sel de fer, pour la préparation d'une composition pharmaceutique, celle-ci étant notamment destinée au traitement de l'asthénie et/ou de l'anémie.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'au moins une protéine complexant le fer et d'au moins un précurseur du métabolisme du NO et/ou d'au moins un donneur chimique de monoxyde d'azote, et éventuellement d'au moins un sel de fer, pour la préparation d'un complément nutritionnel destiné à des sujets présentant un déficit en fer ou un risque de déficit en fer, notamment la femme enceinte.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de démonstration de la potentialisation de la fixation du fer dans des cellules épithéliales gastro-intestinales humaines, ainsi qu'aux figures annexées, dans lesquelles :

- la figure 1 montre les effets de l'addition d'un précurseur du métabolisme du NO sur la fixation du fer au niveau cellulaire ;
- la figure 2 montre les effets de l'addition d'un inhibiteur de la voie de la L-arginine sur le taux de fixation du fer au niveau cellulaire ; et

- la figure 3 montre les effets de l'addition d'un donneur chimique de NO (SNAP) sur le taux de fixation du fer au niveau cellulaire.

Il doit être bien entendu toutefois que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en 5 aucune manière une limitation.

**EXEMPLE 1 : DÉMONSTRATION DE L'EFFET DE
POTENTIALISATION DE LA FIXATION DU FER AU NIVEAU
CELLULAIRE PAR UN PRÉCURSEUR DU MÉTABOLISME DU NO**

Le but de cet exemple est de démontrer que la fixation du fer par la 10 Lf au niveau cellulaire est fortement potentialisée en présence d'un précurseur du métabolisme du NO tel que la L-arginine.

A l'état naturel, la Lf bovine (Lf bovine native) présente une saturation en fer de l'ordre de 20 % environ. De la Lf bovine native a été traitée à pH 1 15 de manière à substituer le fer non marqué qu'elle renfermait à l'état naturel par du fer marqué ⁵⁹Fe. La saturation de la Lf native par du fer marqué a abouti à une lactoferrine marquée (Lf-⁵⁹Fe) présentant un taux de saturation en fer marqué de l'ordre de 85 % à 100 %, révélé par absorption spectrophotométrique à 450 nm pour une activité spécifique de 0,03 µCi/µg.

La Lf-⁵⁹Fe a ensuite été purifiée pour éliminer le fer marqué non fixé, 20 par filtration sur gel, sur une colonne de SEPHADEX ® G-75.

Des cellules épithéliales intestinales de la lignée Caco-2 dérivée d'un cancer du colon sont incubées à raisons de 2.10⁶ cellules par ml dans un milieu RPMI 1640 tamponné à pH 7,4 en présence de 25 mmolaire de Hepes, contenant 15 % (v/v) de sérum de veau fcetal, 2 mmol/l de L-glutamine et 1 % (v/v) d'une solution de 25 streptomycine-pénicilline, vendu par la société Gibco.

La fixation du fer au niveau cellulaire est ensuite initiée en rajoutant de la Lf-⁵⁹Fe et/ou du fer marqué et/ou de la L-arginine.

Un des tubes de culture de cellules ne reçoit aucun de ces trois constituants, de façon à servir de témoin.

30 La répartition des constituants, ainsi que les concentrations auxquelles ils sont utilisés figurent dans le Tableau I ci-après :

TABLEAU I

Tubes de cultures de cellules	Lf- ⁵⁹ Fe	Fer radiomarqué (⁵⁹ Fe)	L-arginine
1 (témoin)	-	-	-
2	1 µg	-	-
3	-	-	10 mM
4	1 µg	-	10 mM
5	-	100 µg	-
6	1 µg	100 µg	-
7	-	100 µg	10 mM
8	1 µg	100 µg	10 mM

5 Les cellules sont ensuite incubées pendant une période de 16 heures dans des tubes Eppendorf maintenus en agitation pendant les 2 dernières heures de la période de culture. Durant toute la période d'incubation, le taux de fer cellulaire a été mesuré sur culot de centrifugation des cellules une première fois au bout de 30 minutes (t=0,5) puis au bout d'une heure (t=1), et ensuite toutes les heures (t=2 à t=16), à l'aide
10 d'un appareil de mesure de la radioactivité.

Ainsi que cela peut être observé sur la figure 1, la fixation du fer par les cellules intestinales est observée à partir de t=0,5, avec un maximum entre t=1 et t=2, pour ensuite diminuer jusqu'à t=16. Cet effet démontre que la Lf-⁵⁹Fe est capable de transporter le fer marqué dans la cellule cible, cependant celui-ci n'y est fixé que de
15 manière transitoire puisque le taux de fer radioactif cellulaire diminue par la suite, vraisemblablement par un phénomène de fuite cellulaire. Dans le cas où ces cultures cellulaires sont complémentées par de la L-arginine et éventuellement par du fer radiomarqué (cultures de cellules 4 et 8), on note une augmentation du taux de fixation du fer au niveau cellulaire ainsi qu'une prolongation de la durée de fixation du fer
20 jusqu'après 16 heures de culture.

L'addition d'un précurseur du métabolisme du NO à une composition pharmaceutique contenant une protéine complexant le fer et éventuellement un sel de fer permet donc non seulement d'augmenter la quantité de fer fixé au niveau cellulaire mais également de prolonger la durée de fixation du fer au niveau cellulaire, cet effet 5 étant d'autant plus marqué lorsque ladite composition contient à la fois l'association des trois constituants.

D'autre part, et ainsi que cela apparaît sur la figure 2, si on répète l'expérience réalisée avec les tubes de cultures de cellules 1, 2, 4 et 8 qu'un inhibiteur compétitif de la voie de la L-arginine à savoir le méthyl ester de la N^ω-nitro-L-arginine 10 (le L-NAME) est ajouté à raison de 1mM dans le milieu de culture cellulaire de ces tubes, il apparaît que cette addition entraîne une diminution très importante du taux de fixation du fer au niveau cellulaire, celui-ci étant pratiquement ramené au taux qui est observé lorsque l'incubation des cellules est réalisée sans addition de L-arginine (tube 2). Cette expérience montre qu'en bloquant le métabolisme de la L-arginine par 15 l'utilisation de L-NAME, on bloque la génération de NO par les cellules mises en culture, ce qui indique que le NO endogène est responsable de l'augmentation du taux de fixation du fer au niveau cellulaire.

**EXEMPLE 2 : DÉMONSTRATION DE L'EFFET DE
POTENTIALISATION DE LA FIXATION DU FER AU NIVEAU
CELLULAIRE PAR UN donneur CHIMIQUE DE NO**

Le but de cet exemple est de démontrer que la fixation du fer par la Lf au niveau cellulaire est fortement potentialisée en présence d'un donneur chimique de NO tel que la SNAP.

Des tubes de cultures de cellules épithéliales intestinales ont été 25 préparées et cultivées dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus à l'exemple 1.

La fixation du fer au niveau cellulaire est ensuite initiée en rajoutant de la Lf-⁵⁹Fe et/ou du fer marqué.

Un des tubes de culture de cellules ne reçoit aucun des constituants, 30 de façon à servir de témoin.

La répartition des constituants, ainsi que les concentrations auxquelles ils sont utilisés figurent dans le Tableau II ci-après :

5

TABLEAU II

Tubes de cultures de cellules	Lf- ⁵⁹ Fe	Fer radiomarqué (⁵⁹ Fe)
1 (témoin)	-	-
2	1 µg	-
3	-	100 µg
4	1 µg	100 µg

Les tubes de cultures reçoivent ensuite de la SNAP en des quantités variant entre 0 et 1 µM et la fixation cellulaire de fer radiomarqué est ensuite mesurée à l'aide d'un appareil de mesure de la radioactivité.

10

Ainsi que cela peut être observé sur la figure 2, l'addition de SNAP, à une composition renfermant de la Lf (tubes de cultures de cellules 2) et éventuellement du fer radiomarqué (tubes de cultures de cellules 4) permet d'augmenter le taux de fixation du fer au niveau des cellules épithéliales.

15

Par conséquent, l'addition d'un donneur chimique de NO à une composition pharmaceutique contenant une protéine complexant le fer et éventuellement un sel de fer permet d'augmenter le taux de fixation du fer au niveau cellulaire ; cet effet étant plus marqué lorsque ladite composition contient à la fois l'association des trois constituants.

EXEMPLE 3 : ÉTUDE DU TAUX DE FIXATION DU FER AU NIVEAU CELLULAIRE EN FONCTION DES CONCENTRATIONS

Selon les conditions décrites ci-dessus à l'exemple 1, 12 tubes de cultures de cellules épithéliales ont été préparés.

La fixation du fer au niveau cellulaire est ensuite initiée en rajoutant de la Lf-⁵⁹Fe et/ou du fer marqué et/ou de la L-arginine.

Un des tubes de culture de cellules ne reçoit aucun de ces trois constituants, de façon à servir de témoin.

La répartition des constituants, ainsi que les concentrations auxquelles ils sont utilisés figurent dans le tableau III ci-après :

5

TABLEAU III

Tubes de cultures de cellules	Lf- ⁵⁹ Fe en mg/ml	Fer radiomarqué (⁵⁹ Fe) en mg/ml	L-arginine en mg/ml
Témoin	-	-	-
1	1	-	-
2	0,1	-	-
3	0,01	-	-
4	-	0,1	-
5	1	0,1	-
6	0,1	0,1	-
7	0,01	0,1	-
8	-	-	1
9	1	0,1	1
10	0,1	0,1	1
11	0,01	0,1	1

Le taux de fixation cellulaire du fer a été mesuré au bout de 72 heures d'incubation au moyen d'un appareil de mesure de la radioactivité.

10

Les résultats obtenus pour chacun des 12 tubes figurent dans le tableau IV ci-après :

TABLEAU IV

Tubes de cultures de cellules	Taux de fixation du fer dans les cellules (cpm ^{59}Fe)
Témoin	1
1	1,2 ± 0,1
2	1,0 ± 0,2
3	1,1 ± 0,1
4	1,8 ± 0,1
5	2,1 ± 0,2
6	1,9 ± 0,1
7	1,7 ± 0,1
8	1
9	5,4 ± 0,3
10	4,3 ± 0,2
11	3,1 ± 0,1

Ces résultats montrent qu'aux trois concentrations en Lf testées, on observe une très importante augmentation du taux de fixation du fer au niveau cellulaire lorsque le milieu de culture cellulaire renferme conjointement une protéine complexant le fer, un sel de fer et un précurseur du métabolisme du NO, prouvant ainsi le rôle essentiel que joue la L-arginine sur la potentialisation de la fixation du fer par les cellules.

REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique ou complément nutritionnel caractérisé(e) par le fait qu'elle (qu'il) comprend à titre de principe actif :
 - au moins une protéine complexant le fer, éventuellement en présence d'au moins un sel de fer, et
 - au moins un précurseur du métabolisme du monoxyde d'azote et/ou au moins un donneur chimique de monoxyde d'azote,
 - et éventuellement au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
- 10 2. Composition pharmaceutique ou complément nutritionnel selon la revendication 1, caractérisé(e) par le fait que la ou les protéines complexant le fer sont choisies parmi lactoferrine et la transferrine.
- 15 3. Composition pharmaceutique ou complément nutritionnel selon la revendication 2, caractérisé(e) par le fait qu'elle (qu'il) renferme une lactoferrine d'origine bovine, chevaline, caprine, ovine ou une lactoferrine obtenue par voie synthétique ou recombinante.
4. Composition pharmaceutique ou complément nutritionnel selon la revendication 3, caractérisé(e) par le fait qu'elle (qu'il) renferme une lactoferrine présentant un taux de saturation en fer supérieur à 50 %.
- 20 5. Composition pharmaceutique ou complément nutritionnel selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé(e) par le fait que la ou les protéines complexant le fer sont utilisées à des doses unitaires comprises entre 0,01 mg et 5 mg.
- 25 6. Composition pharmaceutique ou complément nutritionnel selon la revendication 5, caractérisé(e) par le fait que la ou les protéines complexant le fer sont utilisées à des doses unitaires comprises entre 0,1 mg et 1 mg.
- 30 7. Composition pharmaceutique ou complément nutritionnel selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé(e) par le fait que les sels de fer sont choisis parmi les sels ferreux, les sels ferriques, le fumarate de fer, l'oxalate de fer, l'ascorbat de fer, le gluconate de fer, le succinate de fer, l'acétate de fer et le ferédétate.

8. Composition pharmaceutique ou complément nutritionnel selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé(e) par le fait que le ou les sels de fer sont présents au sein de ladite composition ou dudit complément nutritionnel soit sous forme complexée, soit sous forme partiellement complexée ou 5 totalement complexée, à ladite protéine complexant le fer.

9. Composition pharmaceutique ou complément nutritionnel selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé(e) par le fait que le ou les sels de fer sont utilisés à des doses unitaires comprises entre 0,01 et 1 mg.

10. Composition pharmaceutique ou complément nutritionnel selon 10 la revendication 9, caractérisé(e) par le fait que le ou les sels de fer sont utilisés à des doses unitaires comprises entre 0,05 et 0,5 mg.

11. Composition pharmaceutique ou complément nutritionnel selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé(e) par le fait que le ou les précurseurs du métabolisme du monoxyde d'azote sont choisis parmi la L-arginine et 15 ses sels ; les protéines et les peptides constitués d'au moins 10 % en poids de L-arginine.

12. Composition pharmaceutique ou complément nutritionnel selon la revendication 11, caractérisé(e) par le fait que les sels de L-arginine sont choisis parmi le chlorhydrate de L-arginine, le glutamate de L-arginine, et l'aspartate de 20 L-arginine.

13. Composition pharmaceutique ou complément nutritionnel selon la revendication 11, caractérisé(e) par le fait que lesdites protéines et lesdits peptides sont issus d'extraits de lupin.

14. Composition pharmaceutique ou complément nutritionnel selon 25 l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé(e) par le fait que le donneur chimique de monoxyde d'azote est de la S-nitroso-N-acétyl-pénicillamine.

15. Composition pharmaceutique ou complément nutritionnel selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé(e) par le fait que le ou les précurseurs du métabolisme du monoxyde d'azote et/ou le ou les donneurs chimiques 30 de monoxyde d'azote sont utilisés à des doses unitaires comprises entre 0,001 mg et 1 mg.

16. Composition pharmaceutique ou complément nutritionnel selon la revendication 15, caractérisé(e) par le fait que le ou les précurseurs du métabolisme du monoxyde d'azote et/ou le ou les donneurs chimiques de monoxyde d'azote sont utilisés à des doses unitaires comprises entre 0,01 mg et 0,1 mg.

5 17. Composition pharmaceutique ou complément nutritionnel selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé(e) par le fait que le rapport pondéral protéine(s) complexant le fer / précurseur(s) du métabolisme du monoxyde d'azote et/ou donneur(s) chimique(s) de monoxyde d'azote est de préférence compris entre 1/1 et 10/1.

10 18. Composition pharmaceutique ou complément nutritionnel selon la revendication 17, caractérisé(e) par le fait que le rapport pondéral protéine(s) complexant le fer / précurseur(s) du métabolisme du monoxyde d'azote et/ou donneur(s) chimique(s) de monoxyde d'azote est de 1/1.

15 19. Composition pharmaceutique ou complément nutritionnel selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé(e) par le fait qu'elle (qu'il) renferme l'association de :

- de 0,01 mg à 5 mg de lactoferrine,
- de 0,01 à 1 mg d'un sel de fer, et
- de 0,1 mg à 5 mg de L-arginine.

20 20. Composition pharmaceutique ou complément nutritionnel selon la revendication 19, caractérisé(e) par le fait qu'elle (qu'il) renferme l'association de :

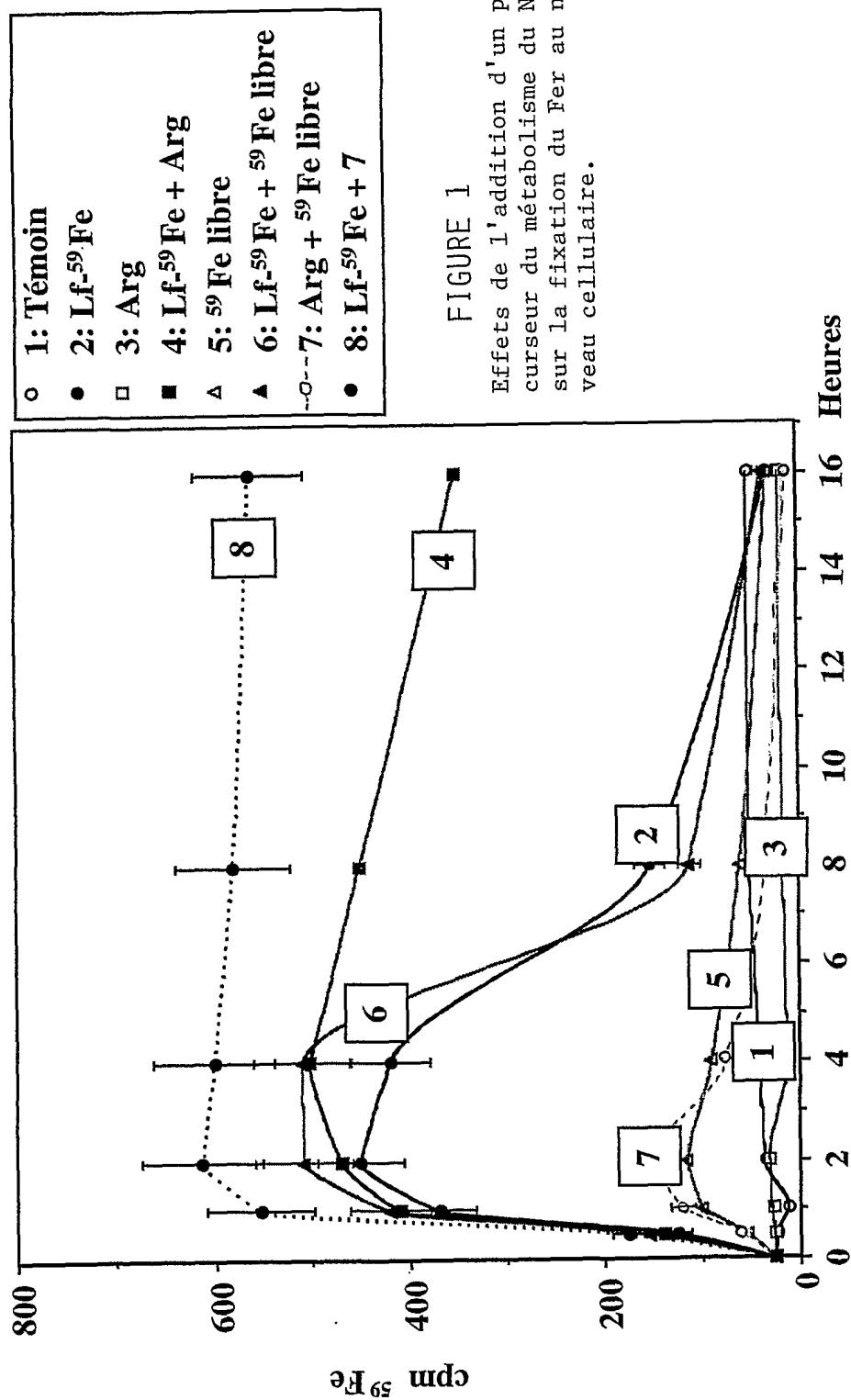
- de 0,01 mg à 1 mg de lactoferrine,
- 0,1 mg d'un sel de fer, et
- 1 mg de L-arginine.

25 21. Composition pharmaceutique ou complément nutritionnel selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé(e) par le fait qu'elle (qu'il) renferme en outre de la superoxyde dismutase.

22. Utilisation d'au moins une protéine complexant le fer et d'au moins un précurseur du métabolisme du monoxyde d'azote et/ou d'au moins un donneur chimique de monoxyde d'azote, et éventuellement d'au moins un sel de fer,

pour la préparation d'une composition pharmaceutique notamment destinée au traitement de l'asthénie et/ou de l'anémie.

23. Utilisation d'au moins une protéine complexant le fer et d'au moins un précurseur du métabolisme du monoxyde d'azote et/ou d'au moins un donneur chimique de monoxyde d'azote, et éventuellement d'au moins un sel de fer,
5 pour la préparation d'un complément nutritionnel.



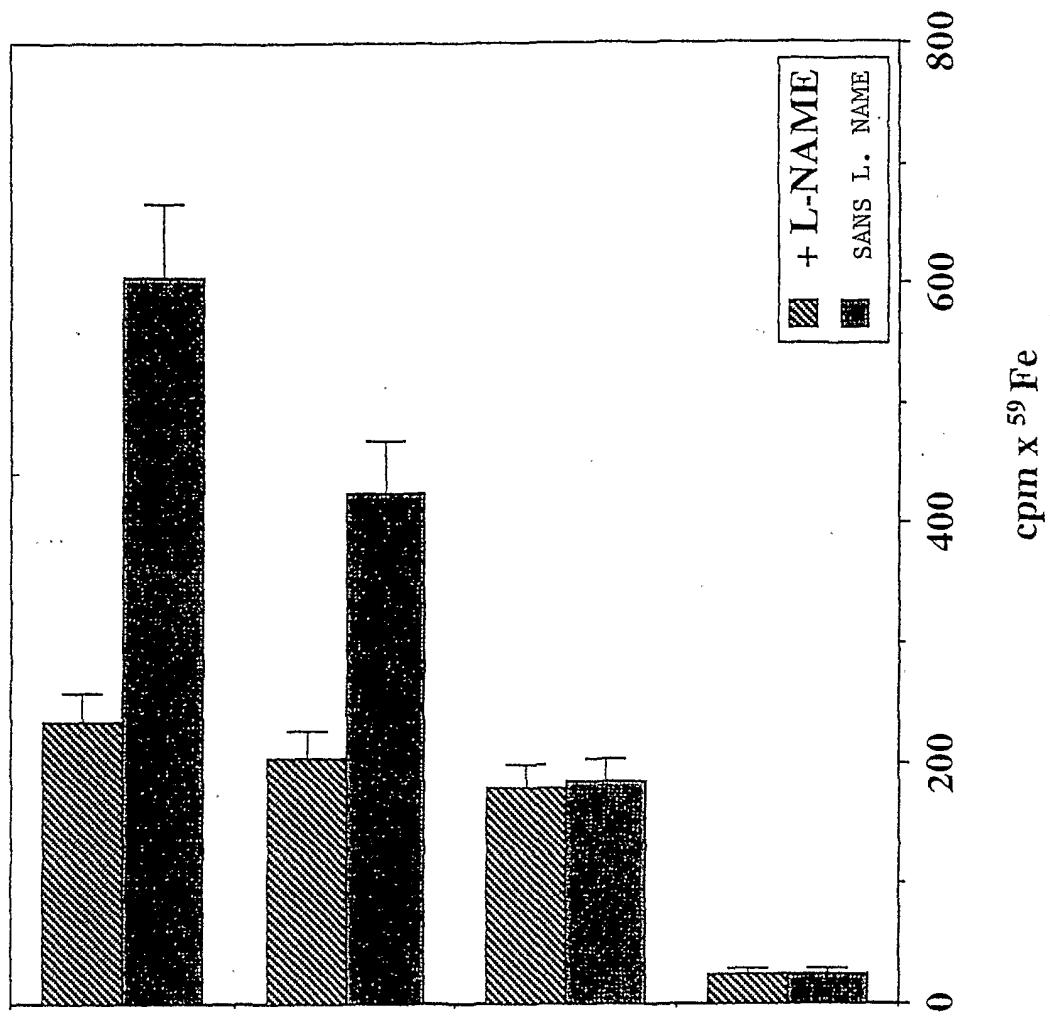


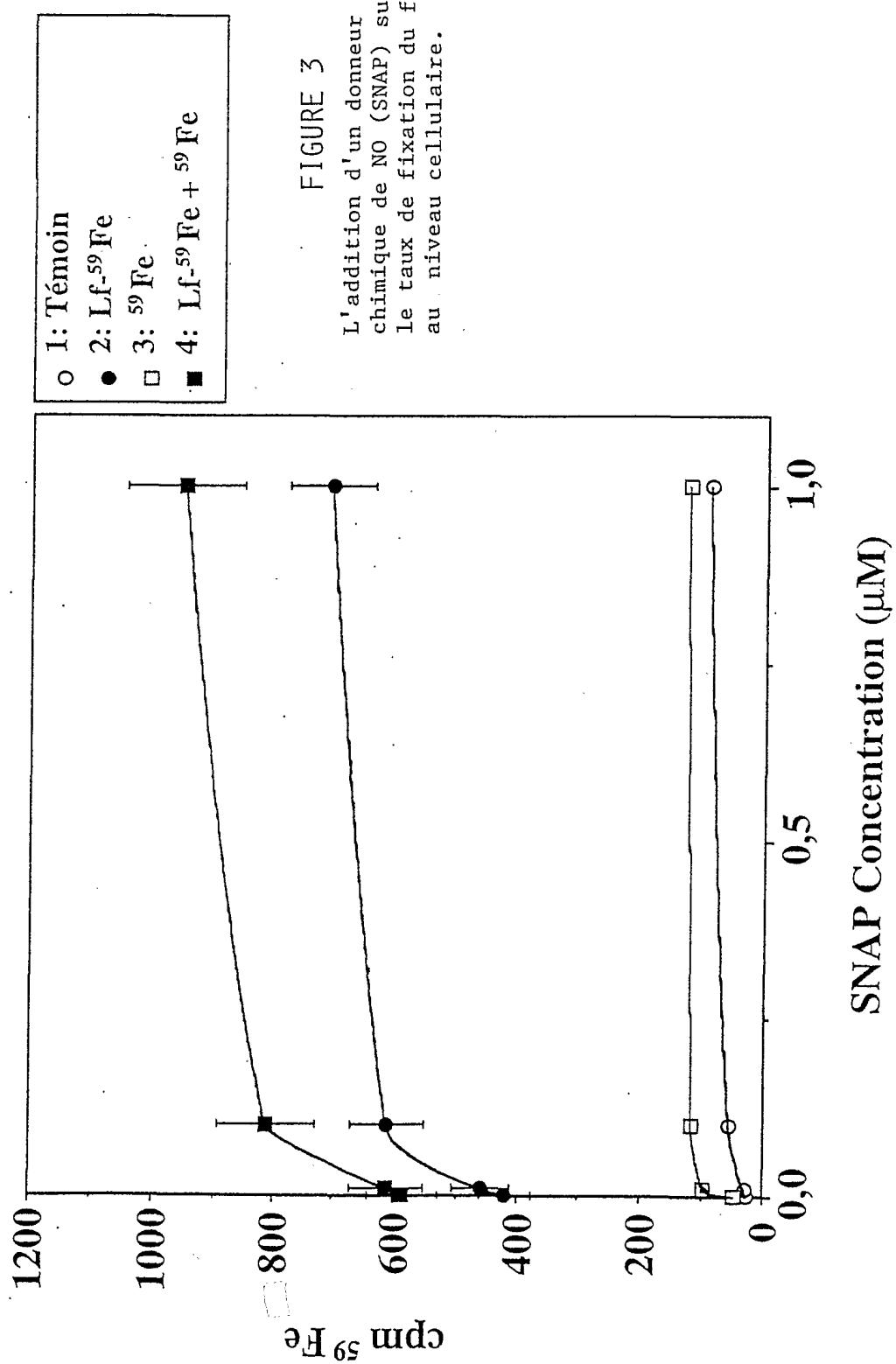
FIGURE 2
Lf-⁵⁹ Fe + Arg + ⁵⁹ Fe
(Tube 8)

Lf-⁵⁹ Fe + Arg
(Tube 4)

Effets de l'addition d'un inhibiteur de la voie de la L. arginine sur le taux de fixation du fer au niveau cellulaire.

Lf-⁵⁹ Fe
(Tube 2)

TEMOIN
(Tube 1)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 01/02469

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K38/40

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

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, BIOSIS, CANCERLIT, MEDLINE, EMBASE, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 33509 A (NUIJENS JAN ;PHARMING BV (NL); BERKEL PATRICK H C VAN (NL)) 6 August 1998 (1998-08-06) claims -----	1-23
A	US 5 789 447 A (GRANGER DANIEL NEIL ET AL) 4 August 1998 (1998-08-04) claims -----	1-23

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *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)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *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
- *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
- *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.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 January 2002

Date of mailing of the international search report

23/01/2002

Name and mailing address of the ISA

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

Authorized officer

Leherte, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No	
PCT/FR 01/02469	

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 9833509	A	06-08-1998	US	6333311 B1		25-12-2001
			AU	6307698 A		25-08-1998
			EP	1017407 A2		12-07-2000
			WO	9833509 A2		06-08-1998
<hr/>						
US 5789447	A	04-08-1998	AT	192922 T		15-06-2000
			AU	704173 B2		15-04-1999
			AU	8130094 A		23-05-1995
			CA	2175467 A1		11-05-1995
			DE	69424560 D1		21-06-2000
			DE	69424560 T2		18-01-2001
			DK	726768 T3		02-10-2000
			EP	0726768 A1		21-08-1996
			ES	2149338 T3		01-11-2000
			GR	3034099 T3		30-11-2000
			JP	9508097 T		19-08-1997
			PT	726768 T		30-11-2000
			WO	9512394 A1		11-05-1995

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

mande internationale No
PCT/FR 01/02469

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61K38/40

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 A61K

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, BIOSIS, CANCERLIT, MEDLINE, EMBASE, PAJ, WPI Data

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 98 33509 A (NUIJENS JAN ;PHARMING BV (NL); BERKEL PATRICK H C VAN (NL)) 6 août 1998 (1998-08-06) revendications -----	1-23
A	US 5 789 447 A (GRANGER DANIEL NEIL ET AL) 4 août 1998 (1998-08-04) revendications -----	1-23

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 (elle 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

15 janvier 2002

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23/01/2002

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

Leherte, C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements sur les autres membres de familles de brevets

Recherche internationale No

PCT/FR 01/02469

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9833509	A 06-08-1998	US 6333311 B1 AU 6307698 A EP 1017407 A2 WO 9833509 A2	25-12-2001 25-08-1998 12-07-2000 06-08-1998
US 5789447	A 04-08-1998	AT 192922 T AU 704173 B2 AU 8130094 A CA 2175467 A1 DE 69424560 D1 DE 69424560 T2 DK 726768 T3 EP 0726768 A1 ES 2149338 T3 GR 3034099 T3 JP 9508097 T PT 726768 T WO 9512394 A1	15-06-2000 15-04-1999 23-05-1995 11-05-1995 21-06-2000 18-01-2001 02-10-2000 21-08-1996 01-11-2000 30-11-2000 19-08-1997 30-11-2000 11-05-1995