

A2

**DEMANDE
DE CERTIFICAT D'ADDITION**

(21)

N° 81 01600

Se référant : à la demande de brevet n° 77 16763 du 1^{er} juin 1977.

(54)

Compositions pharmaceutiques à base d'élastine soluble utilisables par voie interne.

(51)

Classification internationale (Int. Cl. ⁹). A 61 K 37/12.

(22)

Date de dépôt 28 janvier 1981.

(33) (32) (31)

Priorité revendiquée :

(41)

Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 30 du 30-7-1982.

(71)

Déposant : ETABLISSEMENT INVAP, établissement de droit liechtensteinois, résidant au
Liechtenstein.

(72)

Invention de : Ladislav Robert.

(73)

Titulaire : *Idem* (71)

(74)

Mandataire : Cabinet Armengaud jeune, Casanova, Akerman, Lepeudry,
23, boulevard de Strasbourg, 75010 Paris.

Certificat(s) d'addition antérieur(s) :

La présente invention a pour objet des compositions pharmaceutiques à base d'élastine soluble utilisables par voie interne.

Le brevet principal n° 77.16763 (publié sous le n° 2 392 674) concerne des compositions pharmaceutiques, en particulier dermopharmaceutiques, à base d'élastine. En effet, des études avaient montré que l'élastine peut être utilisée pour le traitements des affections cutanées.

Or, de nouvelles études pharmacologiques effectuées avec des peptides d'élastine (élastine soluble) ont montré de manière inattendue que l'élastine soluble administrée par voie interne possède une activité notamment sur la cholestérolémie.

Le but de la présente invention est donc de fournir de nouvelles compositions pharmaceutiques à base d'élastine soluble qui sont utilisables par voie interne.

L'élastine soluble est obtenue par hydrolyse de l'élastine fibreuse qui est une protéine insoluble isolée à partir de tissus animaux, par exemple selon le brevet principal. L'hydrolyse peut être effectuée de manière connue à l'aide d'un acide, d'une base ou d'une élastase, par exemple de la potasse 1N en milieu éthanol/eau (80/20) d'après N.Kornfeld-Poullain et L. Robert, Bull. Soc. Chim. Biol. 50, n° 4, p. 759 (1968). Ces méthodes permettent d'obtenir des peptides d'élastine solubles dont les poids moléculaires sont très variables et dont la majorité se situe entre 12000 et 120 000. Ces peptides sont appelés "élastine soluble" dans le texte.

Pour obtenir une fraction plus homogène de peptides on peut, de manière connue, dialyser contre de l'eau distillée la solution de peptides obtenue par hydrolyse de l'élastine fibreuse suivie de neutralisation et de centrifugation (élimination des sels). Les poids moléculaires des peptides sont déterminés de manière aisée par électrophorèse sur gel acrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium ("SDS") (3%) et d'urée 7,5M. La fraction retenue pour

l'étude pharmacologique résumée ci-après contient des peptides dont le poids moléculaire est supérieur à 25000 environ.

Bien que leur taille soit différente, l'utilisation de ces peptides pour l'étude pharmacologique permet à la fois la conservation des propriétés de la molécule élastine (caractère hydrophobe, association avec les lipides) et son utilisation sous forme soluble dans les liquides physiologiques. On a vérifié que leur composition en acides aminés est sensiblement identique à celle de l'élastine fibreuse (cf. P. Comte et L. Robert, Bull. Soc. Chim. Biol. 50/7-8, 1968, p. 1349-51). L'analyse d'acides aminés a été réalisée sur autoanalyseur "LKB" (colonne 38,5 cm x 1,2 cm; résine "High effect cationic exchange résin DURRUM DC 6A").

L'élastine soluble peut être avantageusement lyophilisée afin d'assurer une meilleure conservation.

L'élastine soluble a été soumise à des essais pharmacologiques.

Aucune toxicité n'a été constatée sur la souris swiss ayant reçu per os jusqu'à 4 g/kg d'élastine soluble.

CHOLESTEROLEMIE.

1) Préliminaire.

26 lapins adultes mâles (poids moyen : 2,300 kg) sont ainsi répartis :

- 25 Groupe I : Régime Normal (7 lapins).
Groupe 2 : Régime Normal + peptides d'élastine (5 lapins).
Groupe 3 : Régime Cholestérol (7 lapins).⁺
Groupe 4 : Régime Cholestérol + Peptides d'élastine (7 lapins).^o

(+) Un lapin est mort au cours de l'expérience.

30 (^o) Deux lapins sont morts au cours de l'expérience.

Les lapins "Régime Normal" reçoivent 100 g de nourriture UAR 112 par jour. Les lapins "Régime Cholestérol"

reçoivent la même nourriture enrichie avec 1% de cholestérol. Les peptides d'élastine sont injectés par voie intrapéritonéale (10 mg/kg), 5 jours par semaine.

2) Dosage du cholestérol plasmatique.

5 Le cholestérol sanguin est dosé par la méthode enzymatique à la catalase ("Kit" de Boehringer Mannheim) au départ et ensuite tous les dix jours jusqu'à la fin de l'expérience.

10 Après 42 jours de traitement, les lapins sont tués et leur aorte est prélevée. L'aorte est coupée entre le coeur de l'animal et le point de départ des artères rénales. Immédiatement après son prélèvement, elle est rincée dans le sérum physiologique stérile et débarrassée des tissus adjacents.

15 L'aorte est découpée longitudinalement pour une observation macroscopique minutieuse. Trois sections de l'aorte sont utilisées pour l'histologie et la microscopie électronique. Les fragments d'aorte sont délipidés, et le cholestérol total contenu dans l'extrait lipidique est évalué par la méthode enzymatique à la catalase.

20 3) Résultats.

a. Cholestérolémie sanguine.

Le cholestérol total sanguin a été dosé les 1^{er}, 11^{ème}, 21^{ème}, 32^{ème} et 42^{ème} jours de l'expérience.

25 Les lapins des groupes I et 2 ont des cholestérolémies similaires et constantes (0,4 g/l) tandis que le taux de cholestérol sanguin des lapins des deux autres groupes devient très élevé à la fin de l'expérience; cette augmentation est toutefois deux fois moins importante chez
30 les lapins qui reçoivent les peptides d'élastine en plus du régime cholestérol (Tableau I suivant ; cholestérolémie en g/l valeurs moyennes).

T A B L E A U I

	1 ^{er} jour	11	21	32	42
	groupe 1	0,4	0,4	0,4	0,4
	groupe 2	0,4	0,4	0,4	0,4
5	groupe 3	0,4	2,7	7,5	8,2
	groupe 4	0,4	1,9	5,4	5,7

Les peptides d'élastines, injectées par voie intrapéritonéale, diminuent donc la quantité de cholestérol circulant.

10

b. Cholestérol dans l'aorte.

Les résultats du dosage du cholestérol total extrait par un mélange chloroforme-méthanol (2:1,V:V) sont rassemblés dans le tableau II suivant :

T A B L E A U II

15		Cholestérol total (mg/100 mg de tissu sec)
	Groupe 1	0,72 \pm 0,31
	Groupe 2	0,68 \pm 0,08
	Groupe 3	1,27 \pm 0,75
20	Groupe 4	0,89 \pm 0,42

On constate qu'il y a une augmentation de la quantité de cholestérol fixé au niveau de l'aorte chez les lapins du groupe 3 (régime cholestérol). Cette quantité de cholestérol fixé diminue, pour retrouver un taux presque normal, quand les lapins sont en plus traités avec les peptides d'élastine (groupe A).

c. Les examens histologique et par microscopie électronique ont montré que, lorsque les lapins soumis au régime hypercholestérolémique sont traités avec les peptides d'élastine (groupe 4), les dégradations tissulaires causées par le régime riche en cholestérol (cellules musculaires lisses vacuolisées et gorgées de lipides, déformation des lames élastiques accumulation de collagène, etc) sont nettement atténuées.

L'étude pharmacologique a donc permis de mettre en évidence que l'élastine soluble agit sur la concentration du cholestérol circulant, et cela seulement lorsqu'il y a hypercholestérolémie. De plus, elle permet d'atténuer les méfaits du régime cholestérol sur les tissus, sans entraîner aucune action défavorable.

Par conséquent l'élastine soluble peut être utilisée comme médicament administrable par voie interne, notamment comme antilipémiant et anticholestérolémiant. Elle est donc indiquée en particulier pour le traitement de l'athérosclérose, et pour la protection des tissus élastiques dans l'organisme (poumons, derme, cartilage élastique) qui sont notamment affectés lors du vieillissement des tissus conjonctifs.

L'élastine soluble peut être administrée par voie parentérale (sous-cutanée, intramusculaire ou intrapéritonéale) à des doses quotidiennes de l'ordre de 2 à 20 mg/kg de poids corporel, ou par voie rectale, notamment dans le traitement des maladies artérielles. Elle peut aussi être administrée par voie orale, par exemple sous forme de comprimés ou de gélules, éventuellement sous enrobage entérosoluble

par exemple en tant que médicament préventif des maladies artérielles telles que l'athérosclérose et pour régulariser l'activité métabolique des tissus conjonctifs.

- Dans les phases aiguës de ces maladies,
- 5 par exemple dans des situations post-infarctus, on peut envisager son injection par voie intraveineuse.

Exemple de gélule administrable par voie orale.

- | | | |
|----|--|----------|
| | - élastine soluble lyophilisée | 100 mg |
| | - stéarate de magnésium | 2 mg |
| 10 | - sucre glace qsp. une gélule de | 150 mg . |

REVENDEICATIONS

1.- Composition pharmaceutique à base
d'élastine selon la revendication 1 du brevet principal,
caractérisée par le fait qu'elle comprend de l'élastine solu-
5 ble et qu'elle se présente sous une forme utilisable par voie
interne.

2.- Composition pharmaceutique selon la
revendication 1, caractérisée par le fait qu'elle se présente
sous une forme administrable par voie parentérale.

10 3.- Composition pharmaceutique selon la
revendication 1, caractérisée par le fait qu'elle se présente
sous une forme administrable par voie orale.

4.- Composition pharmaceutique selon la
revendication 1, caractérisée par le fait qu'elle se pré-
15 sente sous une forme administrable par voie rectale.