

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-520264

(P2004-520264A)

(43) 公表日 平成16年7月8日(2004.7.8)

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 38/16

A 6 1 K 37/14

4 B O 1 8

A 2 3 L 1/305

A 2 3 L 1/305

4 C O 8 4

A 6 1 K 31/198

A 6 1 K 31/198

4 C 2 O 6

A 6 1 P 3/00

A 6 1 P 3/00

A 6 1 P 7/06

A 6 1 P 7/06

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-515293 (P2002-515293)

(86) (22) 出願日 平成13年7月27日 (2001.7.27)

(85) 翻訳文提出日 平成15年1月23日 (2003.1.23)

(86) 国際出願番号 PCT/FR2001/002469

(87) 国際公開番号 W02002/009740

(87) 国際公開日 平成14年2月7日 (2002.2.7)

(31) 優先権主張番号 00/09883

(32) 優先日 平成12年7月27日 (2000.7.27)

(33) 優先権主張国 フランス (FR)

(71) 出願人 503033851

アイソセル ソシエテ アノニム

フランス国 エフ-92200 ヌイイー

シュール-セヌ リュ アンジェリク

ヴァーリエン 18

(74) 代理人 100065215

弁理士 三枝 英二

(74) 代理人 100076510

弁理士 掛樋 悠路

(74) 代理人 100086427

弁理士 小原 健志

(74) 代理人 100090066

弁理士 中川 博司

(74) 代理人 100094101

弁理士 館 泰光

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 鉄錯化蛋白質および一酸化窒素代謝の前駆体および／または一酸化窒素の化学的ドナーを含有する組成物ならびにその使用

(57) 【要約】

本発明は、必要に応じて少なくとも1つの鉄塩の存在下の少なくとも1つの鉄錯化蛋白質、ならびに一酸化窒素代謝の少なくとも1つの前駆体および／または一酸化窒素の少なくとも1つの化学的ドナーを含有する、薬学的組成物またはフードサプリメントと、特に無力症または貧血を処置するための薬学的組成物を製造するためまたはフードサプリメントを製造するための、少なくとも1つの鉄錯化剤および一酸化窒素代謝の少なくとも1つの前駆体および／または一酸化窒素の化学的ドナー、ならびに必要なに応じて少なくとも1つの鉄塩の使用とに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

有効成分として：

- 必要に応じて少なくとも 1 つの鉄塩の存在下の、少なくとも 1 つの鉄錯化蛋白質、および
 - 一酸化窒素代謝の少なくとも 1 つの前駆体および / または一酸化窒素の少なくとも 1 つの化学的ドナー；
- ならびに、必要に応じて、少なくとも 1 つの薬学的に許容されるビヒクル、を含むことを特徴とする、薬学的組成物またはフードサプリメント。

【請求項 2】

前記鉄錯化蛋白質が、ラクトフェリンおよびトランスフェリンから選択されることを特徴とする、請求項 1 に記載の薬学的組成物またはフードサプリメント。

【請求項 3】

ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ起源のラクトフェリン、あるいは合成的にまたは組換え経路によって得られるラクトフェリンを含有することを特徴とする、請求項 2 に記載の薬学的組成物またはフードサプリメント。

【請求項 4】

50% よりも高い鉄飽和度を示すラクトフェリンを含有することを特徴とする、請求項 3 に記載の薬学的組成物またはフードサプリメント。

【請求項 5】

前記鉄錯化蛋白質が、0.01mg ~ 5mg の単位用量で使用されることを特徴とする、前記請求項のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物またはフードサプリメント。

【請求項 6】

前記鉄錯化蛋白質が 0.1mg ~ 1mg の単位用量で使用されることを特徴とする、請求項 5 に記載の薬学的組成物またはフードサプリメント。

【請求項 7】

前記鉄塩が、第一鉄塩、第二鉄塩、フマル酸鉄、シュウ酸鉄、アスコルビン酸鉄、グルコン酸鉄、コハク酸鉄、酢酸鉄、およびフェレデテート (feredetate) から選択されることを特徴とする、前記請求項のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物またはフードサプリメント。

【請求項 8】

前記鉄塩が、錯化形態あるいは前記鉄錯化蛋白質で部分的に錯化されたまたは完全に錯化された形態のいずれかで、前記組成物または前記フードサプリメント中に存在することを特徴とする、前記請求項のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物またはフードサプリメント。

【請求項 9】

前記鉄塩が 0.01 ~ 1mg の単位用量で使用されることを特徴とする、前記請求項のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物またはフードサプリメント。

【請求項 10】

前記鉄塩が 0.05 ~ 0.5mg の単位用量で使用されることを特徴とする、請求項 9 に記載の薬学的組成物またはフードサプリメント。

【請求項 11】

一酸化窒素代謝の前駆体が、L-アルギニンおよびその塩；少なくとも 10 重量% の L-アルギニンからなる蛋白質およびペプチドから選択されることを特徴とする、前記請求項のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物またはフードサプリメント。

【請求項 12】

前記 L-アルギニン塩が、L-アルギニン塩酸塩、L-アルギニングルタメートおよび L-アルギニンアスパルテートから選択されることを特徴とする、請求項 11 に記載の薬学的組成物またはフードサプリメント。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

前記蛋白質および前記ペプチドがルピン (l u p i n) の抽出物に由来することを特徴とする、請求項 1 1 に記載の薬学的組成物またはフードサプリメント。

【請求項 1 4】

前記一酸化窒素の化学的ドナーが S - ニトロソ - N - アセチル - ペニシラミンであることを特徴とする、前記請求項のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物またはフードサプリメント。

【請求項 1 5】

前記一酸化窒素代謝の前駆体および / または前記一酸化窒素の化学的ドナーが、 0 . 0 0 1 m g ~ 1 m g の単位用量で使用されることを特徴とする、前記請求項のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物またはフードサプリメント。

10

【請求項 1 6】

前記一酸化窒素代謝の前駆体および / または前記一酸化窒素の化学的ドナーが、 0 . 0 1 m g ~ 0 . 1 m g の単位用量で使用されることを特徴とする、請求項 1 5 に記載の薬学的組成物またはフードサプリメント。

【請求項 1 7】

鉄錯化蛋白質 / 一酸化窒素代謝の前駆体および / または一酸化窒素の化学的ドナー重量比が、好ましくは 1 / 1 と 1 0 / 1 との間であることを特徴とする、前記請求項のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物またはフードサプリメント。

【請求項 1 8】

鉄錯化蛋白質 / 一酸化窒素代謝の前駆体および / または一酸化窒素の化学的ドナー重量比が、 1 / 1 であることを特徴とする、請求項 1 7 に記載の薬学的組成物またはフードサプリメント。

20

【請求項 1 9】

以下の組み合わせ：

- 0 . 0 1 m g ~ 5 m g のラクトフェリン、
- 0 . 0 1 ~ 1 m g の鉄塩、および
- 0 . 1 m g ~ 5 m g の L - アルギニン、

を含有することを特徴とする、前記請求項のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物またはフードサプリメント。

【請求項 2 0】

30

以下の組み合わせ：

- 0 . 0 1 m g ~ 1 m g のラクトフェリン、
- 0 . 1 m g の鉄塩、および
- 1 m g の L - アルギニン、

を含有することを特徴とする、請求項 1 9 に記載の薬学的組成物またはフードサプリメント。

【請求項 2 1】

スーパーオキシドジスムターゼを更に含有することを特徴とする、前記請求項のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物またはフードサプリメント。

【請求項 2 2】

40

無力症および / または貧血の処置のために特に意図される薬学的組成物を製造するための、少なくとも 1 つの鉄錯化蛋白質、および一酸化窒素代謝の少なくとも 1 つの前駆体および / または一酸化窒素の少なくとも 1 つの化学的ドナー、および必要に応じて少なくとも 1 つの鉄塩の使用。

【請求項 2 3】

フードサプリメントを製造するための、少なくとも 1 つの鉄錯化蛋白質、および一酸化窒素代謝の少なくとも 1 つの前駆体および / または一酸化窒素の少なくとも 1 つの化学的ドナー、および必要に応じて少なくとも 1 つの鉄塩の使用。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

50

本発明は、少なくとも1つの鉄錯化蛋白質および一酸化窒素代謝の少なくとも1つの前駆体を含む薬学的組成物またはフードサプリメント (food supplement)、ならびに無力症および/または貧血の処置に特に意図される薬学的組成物を製造するため、またはフードサプリメントを製造するための、少なくとも1つの鉄錯化蛋白質およびNO代謝の少なくとも1つの前駆体の使用に関する。

【0002】

ラクトフェリン (Lf) およびトランスフェリン (Tf) のような鉄を錯化し得る蛋白質は、多くの生物学的特性を有する。

【0003】

従って、まず、ヒトLfは殺菌活性を有することが、実証された (E. Griffiths et al., 1977, Infection & Immunity, 15 (2), 396 - 401)。

【0004】

ヒトLfは、大抵の生物学的分泌物 (例えば、気管支、唾液、涙液 (lacrymal)、鼻、胃、脾臓、十二指腸または膺の分泌物) 中、およびまた種々の生物学的流体 (例えば、滑液および羊水) 中、および最後に血漿中に見られる。Lfは、大抵の哺乳動物の初乳 (colostrum) および乳汁 (milk) において見られる。乳汁中のLf濃度は、考慮される種および乳汁の成熟に従って変化する。ウシLfのクローニング後に行われた最近の研究は、ウシLfが69%蛋白質配列同一性を示すことを実証する (Pierce et al., Eur. J. Biochem., 1996, 196, 177 - 184)。

【0005】

実際に、ウシLfは、その殺菌活性以外に他の重要な生物学的機能を有し、そしてこれらの機能はヒトLfのそれよりも重要であるようである。詳細には、ウシLfは免疫調節性 (immunoregulatory) および抗酸化特性を有することが実証された (Paul-Eugene et al., Comptes rendus de l'Academie des Sciences francaises, 1993, 316, 113 - 119)。これらの観察によって、このタイプの蛋白質は、細菌感染に対するその保護的活性に加えて、自然免疫を調節することによってまたは造血を刺激することによってのいずれかで、生物に有益であるいくつかの数の免疫刺激 (immunostimulant) および抗酸化特性を有し得ることが明確に実証された。これらの特性は、腸細胞 (enterocytes) (Iyer and Lonnerdal, Eur. J. Clin. Nutr., 1993, 47, 232 - 241)、食細胞 (H.S. Birgens, 1991, Danish Medical Bulletin, 38 (3), 244 - 252)、およびリンパ球 (Bennet and Davis, J. Immunol., 1981, 127, 1211 - 1216; Birgens et al., Br. J. Haematol., 1983, 54, 383 - 388) のような、数タイプの細胞の表面でのLfレセプターの存在に起因する。

【0006】

Lfは、ウシの乳汁または初乳において強く示される (数mg/l)。従って、フードサプリメント分野における半精製 (semipurified) 形態でのおよび薬学分野における精製形態でのその使用が、とりわけ、特に鉄欠乏症の場合に、細胞レベルでの鉄輸送および固定 (fixation) を提供するために、貧血の場合に造血を刺激するために、特に消化管における、特定の病原性細菌因子を排除するために [食物アレルギーおよび不耐性と戦うことにおける機能性サプリメントとして、または例えばスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) のような特定の抗酸化産物についての機能性サプリメントとして]、完全に想像され得る。

【0007】

研究によって、鉄の腸吸収におけるLfの重要性が実証された。詳細には、ヒト胃腸上皮細胞 (Caco-2) への鉄の輸送は、硫酸第一鉄のような遊離形態の鉄を使用するより

もむしろ、錯化形態の鉄を含有するヒトLfを使用して優先的に行われる(T. M. Cox et al., 1979, Biochimica & Biophysica Acta, 558, 129-141)。

【0008】

鉄およびLfを利用可能とするためのいくつかのメカニズムが提案された：1)鉄が、恐らくインタクトなLfによって、腸細胞を介して輸送される(T. Mikogami et al., 1994, American J. Physiol., 267, 308-315)；2)鉄が原形質膜で放出される(Roiron-Lagroux and Figarella, 1990, Biochimica & Biophysica Acta, 170, 837-842)；3)鉄が、Lfの吸着およびそのリソソーム分解の後に放出される[分解産物は経細胞経路によって輸送される](Sanchez et al., 1996, Biochimica & Biophysica Acta, 1289, 291-297)。

【0009】

ラクトフェリンのような乳蛋白と鉄塩との組み合わせを含有する薬学的組成物がまた提案された；しかし、このタイプの組成物は、細胞レベルで鉄輸送を提供するが、長時間持続性(long-lasting)様式での細胞におけるその固定(fixation)を可能にしない。

【0010】

Lfを使用して鉄輸送を行うことは可能であるように見える一方、細胞レベルでの長時間持続性鉄固定は、特に貧血の処置におけるこのタイプのプロダクトの使用に重大な因子のままである。しかし、今のところ、細胞レベルでの鉄の輸送および固定の両方を可能にする薬学的組成物は、提案されていない。

【0011】

この課題を解決するために、本発明者らは、本発明の主題を明らかにした。

【0012】

従って、本発明の主題は、有効成分として：

- 必要に応じて少なくとも1つの鉄塩の存在下の、少なくとも1つの鉄錯化蛋白質、および
 - 一酸化窒素(NO)代謝の少なくとも1つの前駆体および/または一酸化窒素の少なくとも1つの化学的ドナー(chemical donor)；
- ならびに、必要に応じて、少なくとも1つの薬学的に許容されるビヒクル、を含むことを特徴とする、薬学的組成物またはフードサプリメントである。

【0013】

本発明者らは、実際に、長時間持続性細胞性鉄固定が、NO代謝の少なくとも1つの前駆体の存在下においておよび/または一酸化窒素の少なくとも1つの化学的ドナーの存在下において、高度に増強される(potentiated)ことを実証した。

【0014】

本発明に従う薬学的組成物またはフードサプリメント中に使用され得る鉄錯化蛋白質(iron-complexing proteins)は、好ましくは、ラクトフェリン(Lf)およびトランスフェリンが使用される。Lfの使用が特に好ましい。

【0015】

Lfは、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ起源であってもよく、あるいは合成的にまたは組換え経路によって得てもよい。組換えLfの中でも、特に、国際出願WO 97/45136およびWO 98/50543に記載されるものが言及され得る。

【0016】

一般的に、鉄錯化蛋白質(iron-complexing proteins)は、天然形態、またはそれらの鉄飽和度を増加させるために修飾形態で使用され得る。

【0017】

例えば、Lfを使用する場合、従って、約20%のオーダーの鉄飽和度を示す天然状態の

L f (天然 L f) と比較して、約 80% よりも大きな値までその鉄飽和度を増加させるために、それを鉄塩の存在下、酸 pH で処理してもよい。

【0018】

本発明の有利な実施形態によれば、好ましくは、50% より大きな、そしてなおより優先的に 80% より大きな鉄飽和度を示すラクトフェリンが使用される。

【0019】

鉄錯化蛋白質は、好ましくは、約 0.01 mg ~ 5 mg、そしてなおより好ましくは約 0.1 mg ~ 1 mg の単位用量で使用される。

【0020】

本発明に従う薬学的組成物またはフードサプリメント中に必要に応じて使用され得る鉄塩の中でも、特に、第一鉄塩（硫酸塩、塩化物）、第二鉄塩（塩化物、硫酸塩、リン酸塩）、フマル酸鉄、シュウ酸鉄、アスコルビン酸鉄、グルコン酸鉄、コハク酸鉄、酢酸鉄、およびフェレデレート (feredetate) が言及され得る。 10

【0021】

それらが使用される場合、鉄塩は、本発明に従う薬学的組成物またはフードサプリメント中に、錯化されていない (noncomplexed) 形態 [すなわち、鉄塩は、鉄錯化蛋白質で錯化されていない]、あるいは鉄錯化蛋白質で部分的に錯化されたまたは完全に錯化された形態のいずれかで存在し得る。

【0022】

それらが本発明に従う薬学的組成物またはフードサプリメント中に存在する場合、鉄塩は、好ましくは、約 0.01 ~ 1 mg、そしてなおより優先的には約 0.05 ~ 0.5 mg の単位用量で使用される。 20

【0023】

NO 代謝の前駆体の中でも、L - アルギンおよびその塩、例えば、L - アルギニン塩酸塩、L - アルギニングルタメートおよび L - アルギニンアスパルテート；L - アルギニンに富む、即ち少なくとも 10 重量% の L - アルギニンからなる、蛋白質およびペプチドが言及され得、そして中でも、特に、ルピン (lupin) の抽出物から誘導される蛋白質およびペプチドが言及され得る。

【0024】

一酸化窒素の化学的ドナー (chemical donors) の中でも、S - ニトロソ - N - アセチルペニシラミン (SNAP) が言及され得る。 30

【0025】

NO 代謝の前駆体および / または NO の化学的ドナーは、好ましくは、約 0.001 mg ~ 1 mg、そしてなおより特別には約 0.01 mg ~ 0.1 mg の単位用量で使用される。

【0026】

L - アルギニンおよび / またはその塩が、本発明に従う薬学的組成物またはフードサプリメント中に存在する場合、それらは、好ましくは約 0.1 mg ~ 5 mg、そしてなおより特別には約 0.5 ~ 2 mg の単位用量で使用される。

【0027】

本発明によれば、鉄錯化蛋白質 / NO 代謝の前駆体および / または NO の化学的ドナー重量比は、好ましくは、1 / 1 と 10 / 1 との間である。 40

【0028】

本発明の特に好ましい実施形態によれば、鉄錯化蛋白質 / NO 代謝の前駆体および / または NO の化学的ドナー比は、1 / 1 (重量対重量) である。

【0029】

本発明によれば、以下の組み合わせ：

- 0.01 mg ~ 5 mg のラクトフェリン、
- 0.01 ~ 1 mg の鉄塩、および
- 0.1 mg ~ 5 mg の L - アルギニン、

を含有する薬学的組成物またはフードサプリメントが好ましく与えられる。

【0030】

本発明によれば、以下の組み合わせ：

- 0.01mg ~ 1mg のラクトフェリン、
- 0.1mg の鉄塩、および
- 1mg のL-アルギニン、

を含有する薬学的組成物またはフードサプリメントが、なにより特に好ましく与えられる。

【0031】

本発明の薬学的組成物は、特に貧血の場合に造血を刺激するため、そして無力症の処置のために使用され得る特性を有する。更に、ラクトフェリンの固有の生物学的特性のために、本発明に従う薬学的組成物はまた、それが鉄錯化蛋白質としてラクトフェリンを含有する場合、食物アレルギーおよび不耐性と戦うことにおける機能性サプリメントとして、または特定の抗酸化産物（例えば、特に、SOD）と組み合わせる機能性サプリメントとして、（特に、消化管中の）病原性細菌因子の排除のために使用され得る。 10

【0032】

この点において、鉄錯化蛋白質として少なくとも1つのラクトフェリン、およびSODを含有する、本発明に従う薬学的組成物またはフードサプリメントが、特に好ましい。

【0033】

本発明に従うフードサプリメントは、特に妊婦における、鉄欠乏症または鉄欠乏症の危険性を防止するために使用され得る特性を有する。 20

【0034】

本発明に従う薬学的組成物はまた、無力症および/または貧血の処置に意図される薬学的組成物に慣用的に使用されるものような、1以上の更なる有効成分を含有し得、そして中でも、特に、ビタミンB₁₂、葉酸（または、ビタミンB₆）およびアスコルビン酸（または、ビタミンC）のようなビタミン；補酵素Q10が言及され得る。

【0035】

本発明に従う薬学的に許容されるビヒクルは、好ましくは、1以上の、薬学的組成物を調製するために慣用的に使用される賦形剤、例えば、抗凝集剤（anti-aggregating agents）、抗酸化剤、色素、フレーバー改良剤（flavor modifiers）、スムージング剤（smoothing agents）、アセンブリング剤（assembling agents）、単離剤（isolating agents）、および一般的に、薬学産業において慣用的に使用される任意の賦形剤からなる。 30

【0036】

当然ながら、当業者は、この場合、必要に応じて使用される賦形剤は、本発明と関連する固有の特性と適合性であることを確認するだろう。

【0037】

本発明に従う薬学的組成物は、好ましくは、8日間、1日当たり1または2用量の割合で、経口投与される。

【0038】

それは、種々の形態、例えば、錠剤、カプセル剤、飲用懸濁剤、ロゼンジ（lozenges）の形態、または経口投与法に好適な任意の他の形態であり得る。 40

【0039】

本発明に従うフードサプリメントは、好ましくは経口的に吸収され、そして種々の形態、例えば、錠剤、カプセル剤、飲用懸濁剤、ロゼンジの形態、またはフードサプリメントの通常のプレゼンテーション（presentation）に好適な任意の他の形態であり得る。

【0040】

本発明の主題はまた、薬学的組成物〔この組成物は、無力症および/または貧血の処置に特に意図される〕を製造するための、少なくとも1つの鉄錯化蛋白質、およびNO代謝の 50

少なくとも1つの前駆体および/または一酸化窒素の少なくとも1つの化学的ドナー、および必要に応じて少なくとも1つの鉄塩の使用である。

【0041】

本発明の主題はまた、特に妊婦における、鉄欠乏症または鉄欠乏症の危険を示す個体に意図されるフードサプリメントを製造するための、少なくとも1つの鉄錯化蛋白質、およびNO代謝の少なくとも1つの前駆体および/または一酸化窒素の少なくとも1つの化学的ドナー、および必要に応じて少なくとも1つの鉄塩の使用である。

【0042】

上記アレンジメントに加えて、本発明はまた、ヒト胃腸上皮細胞における鉄固定の増強 (potentiation) の実証の実施例およびまた添付の図面に言及する、以下の説明から明らかとなるであろう他のアレンジメントを含む。 10

【0043】

しかしながら、これらの実施例は本発明の主題の例示目的のみで与えられ、それらは決してその限定を構成しないことが、明確に理解されるべきである。

【0044】

実施例1：NO代謝の前駆体による、細胞レベルでの鉄固定の増強効果の実証

この実施例の目的は、細胞レベルでのLfによる鉄固定が、NO代謝の前駆体（例えば、L-アルギニン）の存在下で高度に増強されることを実証することである。

【0045】

天然状態において、ウシLf（天然ウシLf）は、約20%のオーダーの鉄飽和を示す。天然ウシLfをpH1で処理して、天然状態で含まれる非標識鉄を、⁵⁹F標識化鉄で置換した。標識化鉄での天然Lfの飽和は、85%～100%のオーダーの標識化鉄飽和度を示す標識化ラクトフェリン（Lf-⁵⁹Fe）を生じさせ、これは、0.03 μCi / μgの比放射能についての450 nmでの分光光度吸収によって明らかにされた。 20

【0046】

次いで、Lf-⁵⁹Feを、固定されていない標識化鉄を除去するために、SEPHADEX（登録商標）G-75のカラムにおけるゲル濾過によって精製した。

【0047】

結腸癌から誘導されたCaco-2株の腸上皮細胞を、Gibco社によって販売される、15%（v/v）のウシ胎仔血清、2 mmol/lのL-グルタミンおよび1%（v/v）のストレプトマイシン-ペニシリンの溶液を含有する、25ミリモル（mmolar）のHepesの存在下、pH7.4で緩衝化されたRPMI 1640培地において、1 ml当たり2 × 10⁶細胞の割合で、インキュベートした。 30

【0048】

次いで、細胞レベルでの鉄固定を、Lf-⁵⁹Feおよび/または標識化鉄および/またはL-アルギニンを添加することによって開始した。

【0049】

細胞培養チューブの1つは、コントロールとして機能するように、これら3つの成分をいずれも受容しなかった。

【0050】

成分の分布、およびそれらが使用された濃度は、以下の表Iに示される：

【0051】

【表1】

表 1

細胞培養 チューブ	Lf- ⁵⁹ Fe	放射標識化鉄 (⁵⁹ Fe)	L-アルギニン
1 (コントロール)	-	-	-
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

10

【0052】

次いで、細胞を、E p e n d o r fチューブにおいて16時間インキュベートし、培養期間の最後の2時間撈拌を維持した。インキュベート期間にわたって、細胞性鉄 (c e l l u l a r i r o n) の量を、放射活性を測定するための装置を使用して、最初、30分後 (t = 0 . 5) 、次いで1時間後 (t = 1) 、次いで毎時間後 (t = 2 ~ t = 16) 、細胞の遠心分離ペレットによって測定した。

【0053】

図1に観察され得るように、腸細胞による鉄固定は、t = 0 . 5 から観察され、t = 1 と t = 2 との間で最大となって、その後 t = 16 まで減少する。この効果は、L f - ⁵⁹ F e が標的細胞へ標識化鉄を輸送し得；しかし、この鉄は、細胞性放射活性鉄が、恐らく細胞性漏出 (c e l l u l a r l e a k a g e) の現象によって、引き続いて減少するので、その中に一時的に固定されるだけであることを実証する。これらの細胞培養物に、L - アルギニン、および必要に応じて放射標識化鉄で補充された場合 (細胞培養物4および8) 、鉄固定の持続期間の延長化が培養の16時間までであるように、細胞レベルでの鉄固定度の増加が気付かれる。

【0054】

従って、鉄錯化蛋白質および必要に応じて鉄塩を含有する薬学的組成物へNO代謝の前駆体を添加することは、細胞レベルで固定される鉄の量を増加させることだけでなく、細胞レベルでの鉄固定の持続時間を延長することを可能にし、この効果は、該組成物が同時に3つの成分の組み合わせを含有する場合に、なお一層顕著である。

【0055】

更に、そして図2に見られるように、細胞培養チューブ1、2、4および8で行われる実験を繰り返し、かつL - アルギニン経路の競合的インヒビター、即ちN - ニトロ - L - アルギニンメチルエステル (L - N A M E) を、これらのチューブの細胞培養培地へ1 m M の割合で添加した場合、この添加は、細胞レベルでの鉄固定度の非常に大きな減少へと至り、これは、細胞をL - アルギニン無添加でインキュベートする場合 (チューブ2) に観察される程度へ実質的に戻されるようである。この実験は、L - N A M E を使用してL - アルギニン代謝をブロックすることによって、培養物中に配置された細胞によるNOの産生がブロックされることを示し、これは、内因性NOが細胞レベルでの鉄固定度の増加を担うことを示している。

【0056】

実施例2：NOの化学的ドナーによる細胞レベルでの鉄固定の増強効果の実証

この実施例の目的は、細胞レベルでのL f による鉄固定がNOの化学的ドナー (例えば、

50

S N A P) の存在下で高度に増強されることを実証することである。

【 0 0 5 7 】

腸上皮細胞培養物のチューブを、実施例 1 において上述したものと同一条件下で、調製および培養した。

【 0 0 5 8 】

次いで、細胞レベルでの鉄固定を、L f - ⁵⁹ F e および / または標識化鉄を添加することによって開始した。

【 0 0 5 9 】

細胞培養チューブの 1 つは、コントロールとして役立つように、該成分をいずれも受容しなかった。

10

【 0 0 6 0 】

成分の分布、およびそれらが使用された濃度は、以下の表 I I に示される：

【 0 0 6 1 】

【表 2】

表 II

細胞培養 チューブ	LF- ⁵⁹ Fe	放射標識化鉄 (⁵⁹ Fe)
1 (コントロール)	-	-
2	1 μg	-
3	-	100 μg
4	1 μg	100 μg

20

【 0 0 6 2 】

次いで培養チューブに、0 ~ 1 μ M の範囲の量の S N A P を受容させ、次いで、放射標識化鉄の細胞固定を、放射活性を測定するための装置を使用して測定した。

【 0 0 6 3 】

図 2 に観察され得るように、L f (細胞培養チューブ 2) および必要に応じて放射標識化鉄 (細胞培養チューブ 4) を含有する組成物への S N A P の添加は、上皮細胞における鉄固定度を増加させることを可能にする。

30

【 0 0 6 4 】

従って、鉄錯化蛋白質および必要に応じて鉄塩を含有する薬学的組成物へ N O の化学的ドナーを添加することは、細胞レベルでの鉄固定度を増加させることを可能にし、この効果は、該組成物が同時に 3 つの成分の組み合わせを含有する場合により顕著である。

【 0 0 6 5 】

実施例 3：濃度の関数としての細胞レベルでの鉄固定度の研究

上皮細胞培養物の 1 2 チューブを、実施例 1 において上述した条件に従って調製した。

【 0 0 6 6 】

次いで、細胞レベルでの鉄固定を、L f - ⁵⁹ F e および / または標識化鉄および / または L - アルギニンを添加することによって開始した。

40

【 0 0 6 7 】

細胞培養チューブの 1 つは、コントロールとして機能するように、これら 3 つの成分をいずれも受容しなかった。

【 0 0 6 8 】

成分の分布、およびそれらが使用された濃度は、以下の表 I I I に示される：

【 0 0 6 9 】

【表 3】

表 III

細胞培養 チューブ	Lf- ⁵⁹ Fe (mg/ml)	放射標識化鉄 (⁵⁹ Fe) (mg/ml)	L-アルギニン (mg/ml)
コントロール	-	-	-
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

10

20

【 0 0 7 0 】

鉄の細胞固定度を、放射活性を測定するための装置を使用して、72時間のインキュベーション後に測定した。

【 0 0 7 1 】

12チューブの各々について得られた結果が、以下の表IVにおいて見られる：

【 0 0 7 2 】

【 表 4 】

30

表 IV

細胞培養チューブ	細胞中の鉄固定度 (cpm ⁵⁹ Fe)
コントロール	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

10

20

【 0 0 7 3 】

これらの結果は、試験された L f の 3 つの濃度で、細胞レベルでの鉄固定度の非常に大きな増加が、該細胞培養培地が同時に鉄錯化蛋白質、鉄塩および NO 代謝の前駆体を含有する場合に観察され、従って、L - アルギニンは細胞による鉄固定の増強において役割を果たすことを示す。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、細胞レベルでの鉄固定に対する、NO 代謝の前駆体の添加の効果を示す。

30

【図 2】

図 2 は、細胞レベルでの鉄固定度に対する、L - アルギニン経路におけるインヒビターの添加の効果を示す。

【図 3】

図 3 は、細胞レベルでの鉄固定度に対する、NO の化学的ドナー (S N A P) の添加の効果を示す。

【国際公開パンフレット】

(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.
- (21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR01/02469
- (22) Date de dépôt international : 27 juillet 2001 (27.07.2001)
- (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
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : ISOCCELL S.A. [FR/FR]; 18, rue Angélique Verien, F-92200 Neuilly-sur-Seine (FR).
- (72) Inventeur : DUGAS, Bernard [FR/FR]; 4 square des Muses, F-91370 Verrières le Buisson (FR).
- (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, 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.
- (84) États désignés (régional) : 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).
- Publiée :
— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues
- 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.

(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

(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.

WO 02/09740 A1

WO 02/09740

PCT/FR01/02469

1

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*
15 & 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).

25 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

WO 02/09740

PCT/FR01/02469

2

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- 20 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).

WO 02/09740

PCT/FR01/02469

3

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
- 20 acceptable.

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.

La Lf peut être d'origine bovine, chevaline, caprine, ovine ou bien

30 encore être obtenue par voie synthétique ou recombinante. Parmi les Lf recombinantes,

WO 02/09740

PCT/FR01/02469

4

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.

WO 02/09740

PCT/FR01/02469

5

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

WO 02/09740

PCT/FR01/02469

6

- 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 B₉), 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.

WO 02/09740

PCT/FR01/02469

7

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

WO 02/09740

PCT/FR01/02469

8

- 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 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 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 de manière à substituer le fer non marqué qu'elle renfermait à l'état naturel par du fer marqué ^{59}Fe . La saturation de la Lf native par du fer marqué a abouti à une lactoferrine marquée (Lf- ^{59}Fe) 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 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

La Lf- ^{59}Fe a ensuite été purifiée pour éliminer le fer marqué non fixé, 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 2.10^6 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 fœtal, 2 mmol/l de L-glutamine et 1 % (v/v) d'une solution de streptomycine-pénicilline, vendu par la société Gibco.

La fixation du fer au niveau cellulaire est ensuite initiée en rajoutant de la Lf- ^{59}Fe 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 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.

WO 02/09740

PCT/TR01/02469

10

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 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^o-nitro-L-arginine (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 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 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, 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 :

TABLEAU II

Tubes de cultures de cellules	Lf- ⁵⁹ Fe	Fer radiomarké (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 radiomarké est ensuite mesurée à l'aide d'un appareil de mesure de la radioactivité.

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 radiomarké (tubes de cultures de cellules 4) permet d'augmenter le taux de fixation du fer au niveau des cellules épithéliales.

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.

WO 02/09740

PCT/FR01/02469

12

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 :

15

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.

WO 02/09740

PCT/FR01/02469

14

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
- 5 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.
3. Composition pharmaceutique ou complément nutritionnel selon la revendication 2, caractérisé(e) par le fait qu'elle (qu'il) renferme une lactoferrine
- 15 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.
6. Composition pharmaceutique ou complément nutritionnel selon la
- 25 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.
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'ascorbate de fer, le gluconate de fer, le succinate de fer, l'acétate de fer et le
- 30 ferédétate.

WO 02/09740

PCT/TR01/02469

15

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 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 ses sels ; les protéines et les peptides constitués d'au moins 10 % en poids de
15 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 l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé(e) par le fait que le
25 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.

WO 02/09740

PCT/FR01/02469

16

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.

30 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,

WO 02/09740

PCT/FR01/02469

17

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
5 donneur chimique de monoxyde d'azote, et éventuellement d'au moins un sel de fer, pour la préparation d'un complément nutritionnel.

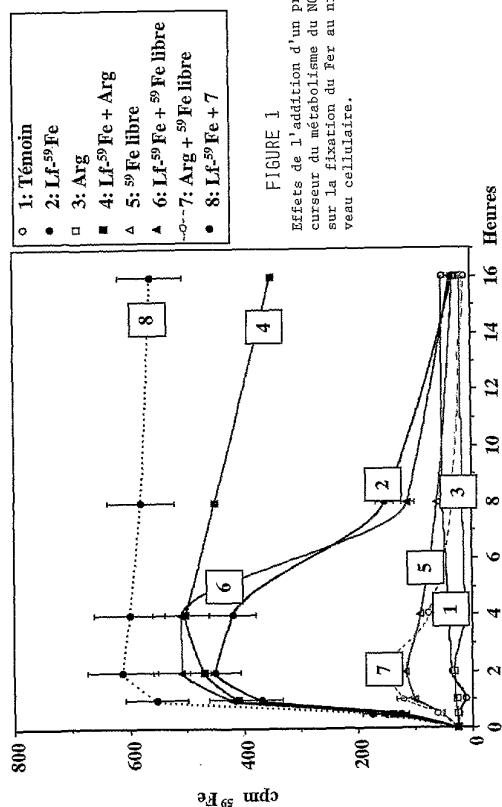


FIGURE 1
Effets de l'addition d'un pré-
curseur du métabolisme du NO
sur la fixation du Fer au ni-
veau cellulaire.

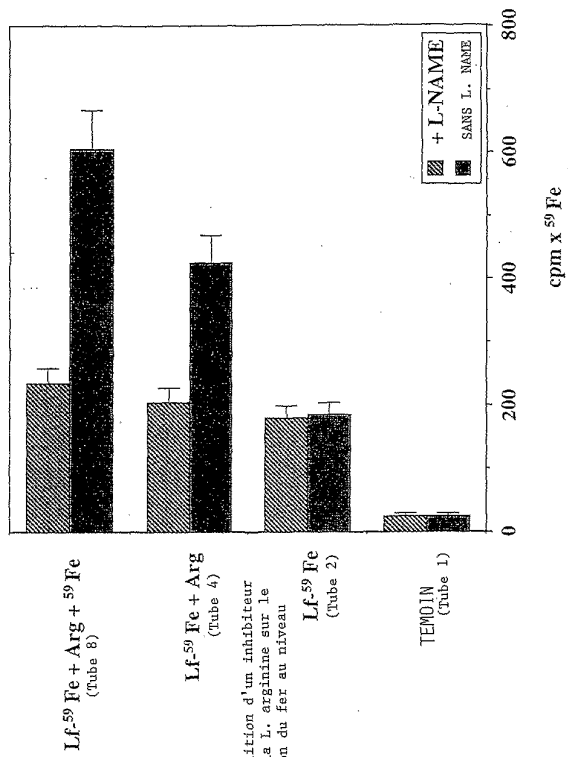
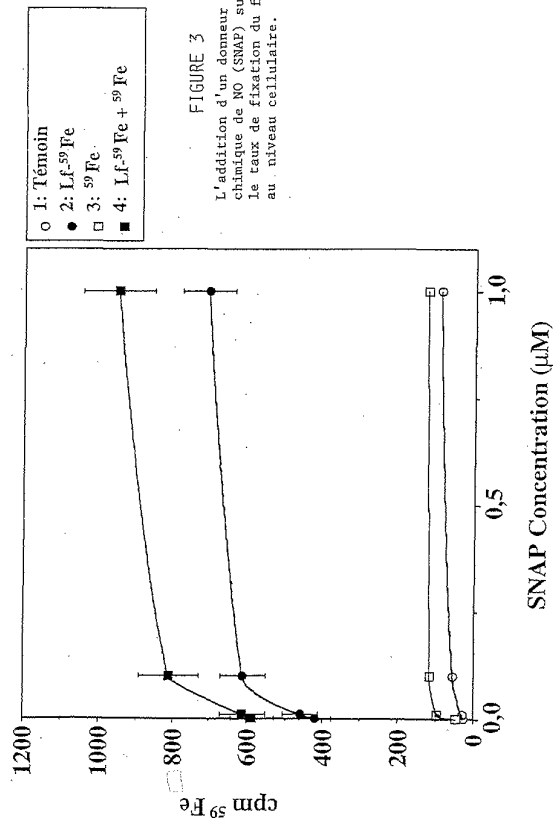


FIGURE 2

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



【国際調査報告】

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
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 (see specification) *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 *Z* 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. 5618 Patentlaan 2 NL - 2002 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3010		Authorized officer Leherde, C

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

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
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

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1998)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Recherche 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	WD 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
<input type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> 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 jouer un rôle 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 tout autre moyen "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'inventeur revendiqué ne peut être considéré comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'inventeur revendiqué ne peut être considéré 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 "Z" 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 Palantiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Leherte, C

Formule PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements sur les membres de familles de brevets

Requête 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	25-12-2001
		AU 6307698 A	25-08-1998
		EP 1017407 A2	12-07-2000
		WO 9833509 A2	06-08-1998
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

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 21/04	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,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

(74)代理人 100099988
弁理士 斎藤 健治

(74)代理人 100105821
弁理士 藤井 淳

(74)代理人 100099911
弁理士 関 仁士

(74)代理人 100108084
弁理士 中野 睦子

(72)発明者 デュガス ベルナル
フランス国 エフ - 9 1 3 7 0 ヴェリエール ル ビュイツソン スクエア デ ミューゼ 4
F ターム(参考) 4B018 MD06 MD09 MD18 MD19 MD20 MD57 MD90 ME02
4C084 AA02 AA19 BA33 BA44 CA20 CA22 CA38 MA02 NA05 ZA55
ZA94 ZB21 ZC21
4C206 AA01 HA32 MA02 MA03 MA04 MA11 MA72 NA14 ZA55 ZA94
ZB21 ZC02 ZC21