

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
—
PARIS
—

①1 N° de publication : **2 553 099**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **84 15547**

⑤1 Int. Cl⁴ : C 12 P 19/26; A 61 K 31/725; C 08 B 37/08.

①2 **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

②2 Date de dépôt : 10 octobre 1984.

③0 Priorité : IT, 11 octobre 1983, n° 49143 A/83; 9 octobre 1984, n° 48979 A/84.

④3 Date de la mise à disposition du public de la demande : BOPI « Brevets » n° 15 du 12 avril 1985.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *FIDIA SpA.* — IT.

⑦2 Inventeur(s) : Francesco Della Valle, Aurelio Romeo et Silvana Lorenzi.

⑦3 Titulaire(s) :

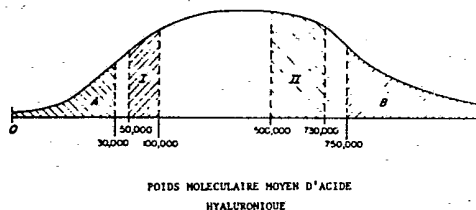
⑦4 Mandataire(s) : Marc-Roger Hirsch.

⑤4 Fractions d'acide hyaluronique ayant une activité pharmaceutique, procédés pour leur préparation et compositions pharmaceutiques les contenant.

⑤7 Deux fractions pharmaceutiques utiles de l'acide hyaluronique sont obtenues, une première fraction ayant un poids moléculaire compris entre 50 000 et 100 000 utile pour la cicatrisation des plaies et une seconde fraction ayant un poids moléculaire moyen compris entre 500 000 et 730 000 utile en injections intra-oculaires et intra-articulaires. Ces fractions d'acide hyaluronique sont, en outre, utiles comme véhicules de médicaments ophtalmiques, procurant des formulations compatibles avec l'épithélium cornéen et améliorant l'activité in vivo de ces médicaments.

Les revendications proposées sont des types suivants :

- A. Revendications 1 à 4 - Méthode de préparation;
- B. Revendications 5 à 8 - Produits chimiques;
- C. Revendications 9 à 14 - Combustions pharmaceutiques;
- D. Revendications 15 à 21 - Méthode de traitement.



FR 2 553 099 - A1

D

1

FRACTIONS D'ACIDE HYALURONIQUE AYANT UNE ACTIVITE PHARMACEUTIQUE,
PROCEDES POUR LEUR PREPARATION ET COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES
LES CONTENANT

5 L'invention concerne des fractions de poids moléculaire spécifique
d'acide hyaluronique (désigné ci-après sous le nom "HA") présentant des
applications thérapeutiques et qui sont non inflammatoires. L'une des
fractions de HA selon l'invention est utile pour faciliter la guérison
des plaies, tandis que la seconde fraction de HA possède une application
10 intra-oculaire, et peut se substituer aux fluides endobulbaires ou
s'utiliser en injection intra-articulaire pour le traitement des articu-
lations osseuses endommagées. Les fractions de HA se sont encore
révélées utiles en tant que véhicule pour médicaments à applications
ophtalmiques, procurant des formulations compatibles avec l'épithélium
15 cornéen et améliorant l'activité des médicaments ophtalmiques.

L'acide hyaluronique est un hétéropolysaccharide existant à l'état
naturel constitué de résidus alternés d'acide D-glucoronique et de
N-acétyl-D-glucosamine. Le HA est un polymère linéaire de poids molécu-
laire élevé, généralement d'environ 8 à 13 millions, et on le trouve
20 dans la revêtement des cellules, la substance de base extra-cellulaire
des tissus conjonctifs des vertébrés, dans le fluide synovial des
articulations, dans les fluides endobulbaires de l'oeil, dans le tissu
du cordon ombilical humain et dans les crêtes de coqs.

Des études antérieures sur l'utilisation du HA sont décrites dans
25 les travaux de Balazs, (brevet des Etats Unis d'Amérique n° 4 141 973)
décrivant une fraction de HA utile au remplacement des fluides endobul-
baires aussi bien qu'à d'autres applications thérapeutiques. Ce brevet
est, cependant, dirigé spécifiquement vers une fraction de HA ayant un
poids moléculaire moyen supérieur à environ 750 000 et de préférence
30 supérieur à environ 1 200 000. Balazs enseigne, spécifiquement, que des
fractions de HA ayant un poids moléculaire moyen inférieur à 750 000 ne

sont pas utilisables en thérapeutique à cause de leur activité inflammatoire. Ces fractions de HA, de poids moléculaire inférieur, sont rejetées par Balazs. Cependant, ceci revient à rejeter environ 90% de la quantité totale de HA disponible susceptible d'être obtenue à partir des
5 tissus, et revient à utiliser seulement une faible quantité (environ 10%) du HA disponible.

Contrairement aux enseignements de Balazs, la demanderesse a découvert que les fractions de HA de poids moléculaire inférieur ont, en fait, une activité pharmaceutique utile. Ainsi, selon la présente
10 invention, environ 80% du HA que l'on peut obtenir à partir de diverses sources sont utilisés. En particulier, la demanderesse a découvert une fraction de HA qui est utile à la stimulation de la guérison des plaies, et une seconde fraction de HA qui est utilisable en injection intra-oculaire, et peut se substituer aux liquides endobulbaires de l'oeil et est
15 utilisable en injections intra-articulaire pour le traitement des articulations endommagées.

La figure 1 est une courbe montrant les différentes fractions d'acide hyaluronique qui ont été identifiées par la demanderesse.

Comme discuté ci-dessus, les études antérieures sur le HA telles
20 que par exemple celles du brevet de Balazs ont été orientées vers l'utilisation de fractions de poids moléculaires élevés ayant un poids moléculaire moyen supérieur à 750 000. La demanderesse a isolé et caractérisé deux nouvelles fractions de HA, l'une ayant un faible poids moléculaire et l'autre ayant un poids moléculaire moyen, qui sont
25 considérées comme étant sensiblement pures et n'ayant pas d'activité inflammatoire. Ces nouvelles fractions de HA peuvent être obtenues à partir de divers tissus conjonctifs qui contiennent des quantités extractibles d'acide hyaluronique. Les fractions spécifiques du produit selon l'invention sont différenciées et séparées selon des techniques de
30 filtration moléculaire.

La première fraction isolée a été nommée "hyalastine" et elle a un poids moléculaire moyen d'environ 50 000 à environ 100 000. Cette fraction de hyalastine a été déterminée comme pouvant convenir en utilisation thérapeutique, vétérinaire et humaine à cause de son acti-
35 vité de guérison des plaies. La seconde fraction isolée a été dénommée "hyalectine" et elle a un poids moléculaire moyen d'environ 500 000 à environ 730 000. Cette fraction de hyalectine est susceptible d'être utilisée dans la chirurgie oculaire en tant que substitut des liquides

endobulbaires et dans les thérapeutiques vétérinaire et humaine des traumatismes et maladies dégénératives des articulations.

La hyalastine peut être administrée soit en injection intradermique, soit en application topique pour la guérison des plaies. La hyalastine, d'autre part, convient aux injections intra-oculaire et intra-articulaire.

La demanderesse a procédé à des études importantes sur les diverses fractions de HA et elle a, de façon significativement plus précise qu'auparavant, déterminé de façon spécifique les fractions thérapeu-
10 tiquement utiles de HA et les fractions inflammatoires et non utiles de HA. Ces études ont eu, pour résultats, de permettre l'identification et l'investigation de deux caractéristiques spécifiques des fractions de HA, à savoir l'activité mobilisatrice des cellules et la viscosité intrinsèque. Le processus de guérison des plaies chez les animaux est
15 facilité par la mobilisation cellulaire et, particulièrement, la mobilisation des fibroblasts. D'autre part, la mobilisation cellulaire ou l'activité de prolifération (c'est-à-dire la mitose) doit être évitée dans les cas de chirurgie à l'intérieur du globe oculaire. Ceci est particulièrement vrai dans les opérations destinées à corriger le
20 décollement de la rétine où une vitesse accrue de cicatrisation pourrait avoir des effets nocifs.

La viscosité intrinsèque est également un paramètre important à considérer dans la détermination de l'utilité d'une fraction de HA. Une fraction ayant une viscosité intrinsèque élevée est utile en chirurgie
25 pour le traitement des traumatismes et des maladies dégénératives des articulations et dans le remplacement des liquides endobulbaires. D'autre part, une viscosité élevée est une caractéristique indésirable des fractions destinées à être utilisées comme médicament pour faciliter la cicatrisation des plaies. En fait, les fractions à utiliser dans la
30 cicatrisation des plaies doivent avoir une faible viscosité de façon à être plus facilement utilisées dans l'application pratique.

Il a été constaté que la fraction de hyalastine identifiée par la demanderesse présente une bonne activité de mobilisation ou de prolifération des cellules et des caractéristiques de faible viscosité. Par
35 conséquent, la hyalastine présente les caractéristiques souhaitables pour une matière suivant à favoriser la cicatrisation des plaies.

Les mêmes caractéristiques rendent la fraction de hyalastine

indésirable pour les traitements comprenant une injection intra-oculaires ou intra-articulaires.

Il a été en outre constaté que la fraction de hyalectine identifiée par la demanderesse présente une activité de mobilisation des
5 cellules ou de prolifération négligeable, tandis que, en même temps, elle possède une viscosité élevée. Ces caractéristiques rendent donc la fraction de hyalectine utile pour des traitements demandant des injections intra-oculaires ou intra-articulaires. Mais, d'autre part, la hyalectine ne peut convenir pour les traitements de cicatrisation des plaies
10 car cette fraction ne présente pas d'activité de mobilisation des cellules.

Lorsque l'on isole des fractions utiles d'acide hyaluronique, il est également important d'obtenir ces fractions qui n'aient pas d'activité inflammatoire. Le brevet de Balazs indiqué ci-dessus enseigne qu'en
15 vue d'obtenir des fractions d'acide hyaluronique sans activité inflammatoire, on doit utiliser exclusivement des fractions ayant un poids moléculaire moyen de plus de 750 000. Ainsi, Balazs rejette les fractions ayant un poids moléculaire moyen inférieur à 750 000 comme étant non utiles à cause de leur activité inflammatoire. Contrairement aux
20 enseignements de Balazs, la demanderesse a trouvé que l'activité inflammatoire attribuée par Balazs aux fractions ayant un poids moléculaire moyen inférieur à 750 000 était en fait due à des impuretés ayant un poids moléculaire moyen inférieur à 30 000. Ainsi, la présente invention procure une méthode qui comprend en une série de techniques de filtra-
25 tion moléculaire associées à des méthodes chimiques permettant l'élimination des fractions inflammatoires ayant un poids moléculaire inférieur à 30 000.

Par les méthodes selon l'invention, il est possible d'obtenir des fractions utiles d'acide hyaluronique n'ayant pas d'activité inflammatoire et qui, lorsqu'on les considère ensemble, constituent un rendement
30 total d'environ 80% de l'acide hyaluronique total disponible à partir des matières de départ particulières. Ce rendement de 80% en acide hyaluronique disponible comprend une fraction combinée qui est une combinaison des fractions de hyalectine et de hyalastine et qui a un poids
35 moléculaire moyen d'environ 250 000 à environ 350 000. Plus spécifiquement, la fraction de hyalectine est obtenue avec un rendement d'environ 30% du HA disponible et la fraction de hyalastine est obtenue avec un rendement d'environ 50% du HA disponible à partir des tissus de départ.

Ce facteur représente une amélioration importante par rapport au procédé du brevet de Balazs discuté ci-dessus en ce sens que la demanderesse a découvert que des quantités significativement accrues de l'acide hyaluronique disponible étaient pharmaceutiquement utiles. En n'utilisant que la fraction ayant un poids moléculaire moyen supérieur à 750 000, le procédé de Balazs ne conduit qu'à un rendement d'environ 10% par rapport à l'acide hyaluronique original obtenu à partir des organes animaux et il rejette environ 90% de l'acide hyaluronique disponible. Ainsi, selon la présente invention, l'emploi de l'extrait hyaluronique total est grandement augmenté.

Une comparaison des rendements relatifs de l'extraction des diverses fractions d'acide hyaluronique est présentée ci-dessous dans le tableau I.

TABLEAU I

type d'acide hyaluronique	g par 100 g de tissu frais	%	référence
acide hyaluronique total à partir de crêtes de coqs	0,08	100	Swann D.A. 1968 Biochim, Biophys. Acta 156, 17-29
HA (type Balazs)	0,08	10	brevet U.S. n° 4 141 973
hyalectine + hamastine	0,6	80	présente invention
hyalectine	0,2	30	présente invention
hyalastine	0,4	50	présente invention
fraction inflammatoire	0,16	20	présente invention

La figure 1 représente, graphiquement, les différentes fractions de HA que la demanderesse a identifiées. La courbe, en traits pleins, en forme de cloche de la figure 1, représente la distribution approximative des fractions de HA disponibles à partir d'un tissu de départ. La zone "B" de la figure 1 représente la fraction de HA identifiée par Balazs dans le brevet des Etats Unis d'Amérique n° 4 143 973 comme étant utile en pharmacie. Les zones "A", I et II dans la figure 1 sont les fractions

identifiées par la demanderesse, la zone A étant la fraction inflammatoire ayant un poids moléculaire moyen inférieur à 30 000; la zone I étant la fraction de hyalastine et la zone II étant la fraction de hyalectine. A partir de cette courbe, on peut voir que la méthode de Balazs rejette la grande majorité du HA extractible disponible en éliminant les fractions de HA ayant un poids moléculaire moyen inférieur à 750 000. La présente invention, d'autre part, permet l'utilisation en pharmacie d'une proportion importante du HA disponible puisque la fraction d'acide hyaluronique de poids moléculaire faible ayant un poids moléculaire moyen inférieur à 30 000 occasionne l'activité inflammatoire que les chercheurs précédents avaient constatée avec divers extraits de HA.

La demanderesse a découvert qu'un pourcentage important de HA disponible pouvait, en fait, être utilisé à des fins thérapeutiques si on opérât la séparation selon les enseignements de la présente invention en fonction de l'application thérapeutique particulière. Tandis que le brevet de Balazs enseigne de façon spécifique l'utilisation de seulement 10% environ du HA disponible, la présente invention permet l'utilisation d'environ 80% du HA disponible, soit sous la forme de la fraction de hyalastine pour les applications de cicatrisation des plaies, soit sous la forme de la fraction de hyalectine pour les applications intra-oculaires et intra-articulaires, soit sous la forme d'une fraction combinée de hyalastine et de hyalectine qui peut aussi être utilisée pour des applications de cicatrisation des plaies.

Les caractéristiques chimiques et physiques des fractions identifiées ont également été étudiées par la demanderesse et ces caractéristiques sont résumées sur le tableau 2.

METHODES DE PREPARATION

EXEMPLE 1 - Procédé d'obtention d'un mélange de fractions de hyalastine et de hyalectine sans activité inflammatoire.

Des crêtes de coqs, soit fraîches, soit congelées (3 000 g) sont émincées dans un hâchoir à viande et elles sont ensuite soigneusement homogénéisées dans un homogénéiseur mécanique. La pâte qui en résulte est placée dans un récipient en acier inoxydable AISI 316 ou dans un récipient en verre en même temps que 10 volumes d'acétone anhydre. Le contenu total est ensuite agité pendant 6 heures à une vitesse de 50 g/mn et on le laisse la séparation se poursuivre pendant 12 heures, puis élimine l'acétone par siphonnage et le rejète.

Ce procédé d'extraction est répété jusqu'à ce que l'acétone rejetée ait atteint le niveau d'humidité correct (méthode de Karl-Fisher).

La substance qui en résulte est alors centrifugée et séchée sous vide à une température convenable pendant 5 à 8 heures. Avec ce procédé, on obtient approximativement 500 à 600 g de poudre sèche à partir des crêtes de coqs.

300 g de la poudre sèche sont alors soumis à un processus de digestion enzymatique avec de la papaïne (0,2 g) dans un milieu aqueux tamponné avec un tampon de phosphate en présence d'une quantité convenable de chlorhydrate de cystéine. Ce mélange est alors agité pendant 24 heures à 60 g/mn et à une température constante de 60 à 65°C. La masse entière est refroidie à 25°C, on ajoute 60 g de Célite (R) et l'agitation est maintenue pendant encore une heure.

15

TABLEAU 2
CARACTERISTIQUES CHIMIQUES ET PHYSIQUES

Fractions	P.M.	viscosité dynamique à 20°C	titre en acide hyaluronique en % de poudre sèche	teneur dans les protéines calculée en albumine bovine	teneur en muco- polysaccharides sulfurés
hyalastine +					
25 hyalectine	250.000-350.000	100 mP.s (conc. 1% p/v)	>96 ^a	<0,5%	<1%
hyalastine	50.000-100.000	600 mP.s (conc. 5% p/v)	>96%	<0,5%	<1%
30 hyalectine	500.000-730.000	170 mP.s (conc. 1% p/v)	>96%	<0,5%	<1%

^a les valeurs consignées représentent le titre en HA après élimination dans l'eau.

Par exemple, un titre de 96% indique que, après élimination d'eau, la poudre contient 4% d'impuretés et 96% d'acide hyaluronique.

Le mélange qui en résulte est filtré jusqu'à obtention d'un liquide clair. Ce liquide clair subit, ensuite, une filtration moléculaire au moyen de membranes ayant une limite d'exclusion moléculaire de 30 000 pour retenir, sur la membrane, les molécules ayant un poids moléculaire

supérieur à 30 000. Cinq à six volumes sont ultra-filtrés à l'origine et, en même temps, de l'eau distillée est continuellement ajoutée au produit. L'addition d'eau distillée est suspendue et le produit est ultra-filtré jusqu'à ce qu'il soit réduit à un tiers de son volume original.

Le résidu liquide est rendu 0,1M par addition de chlorure de sodium et la température est portée à 50°C. 45 g de chlorure de céthylpyridinium sont ajoutés tandis que le produit est agité à 60 g/mn. Ce mélange est agité pendant 60 minutes, et ensuite on ajoute 50 g de Célite^(R) sous agitation, la température du produit est ramenée à 25°C et le précipité formé est recueilli par centrifugation. Le précipité ainsi obtenu est mis en suspension dans une solution de 0,01M de chlorure de sodium (5 litres) contenant 0,05% de chlorure de céthylpyridinium. On l'agite encore pendant 60 minutes à 50°C. La température est abaissée à 25°C et le précipité est centrifugé.

Le processus de lavage est alors répété trois fois et le précipité est finalement rassemblé dans des récipients contenant trois litres d'une solution 0,05M de chlorure de sodium contenant 0,05% de chlorure de céthylpyridinium. On agite à 60 g/mn pendant 60 minutes et on maintient une température constante de 25°C pendant une période de deux heures. Le produit surnageant est éliminé par centrifugation.

Ce mode opératoire est alors répété plusieurs fois avec une solution de chlorure de sodium 0,1M contenant 0,05% de chlorure de céthylpyridinium. Le mélange est centrifugé et ce qui surnage est rejeté. Le précipité est dispersé dans une solution de chlorure de sodium 0,30M contenant 0,05% de chlorure de céthylpyridinium (3 litres). Le mélange est agité et l'on recueille à la fois le précipité et le liquide clair. L'extraction est répétée sur le précipité encore trois fois en utilisant chaque fois 0,5 litre de la même solution aqueuse.

Finalement, le précipité résiduel est éliminé et les liquides clairs sont rassemblés dans un récipient unique. On augmente la température du liquide à 50°C tout en agitant. Le liquide est alors porté à 0,23M avec du chlorure de sodium. On ajoute 1 g de chlorure de chlorure de céthylpyridinium et l'agitation est maintenue pendant 12 heures. Le mélange est refroidi à 25°C et il est ensuite filtré tout d'abord à travers des garnissages de ce Célite^(R) et ensuite à travers un filtre (1 μ).

Le mélange qui en résulte subit alors une ultrafiltration moléculaire supplémentaire à travers des membranes ayant une limite d'exclusion moléculaire de 30 000, en ultrafiltrant 3 volumes originaux avec addition d'une solution de chlorure de sodium 0,33M. L'addition de la solution de chlorure de sodium est interrompue et le volume de liquide est réduit à un quart de son volume original.

La solution ainsi concentrée est précipitée sous agitation (60 g/mn) à une température de 25°C avec trois volumes d'éthanol (95%). Le précipité est recueilli par centrifugation et ce qui surnage est rejeté. Le précipité est dissous dans un litre de solution de chlorure de sodium 0,1M et le processus de précipitation est répété avec trois volumes d'éthanol à 95%.

Le précipité est recueilli et lavé, tout d'abord avec de l'éthanol à 75% (trois fois), ensuite de l'éthanol absolu (trois fois) et troisièmement avec de l'acétone absolue (trois fois).

Le produit ainsi obtenu (fraction de hyalastine + hyalectine) a un poids moléculaire moyen compris entre 250 000 et 350 000.

Le rendement en acide hyaluronique est égal à 0,6% du tissu frais original.

20 EXEMPLE 2 - Méthode d'obtention de la fraction de hyalastine à partir du mélange obtenu par la méthode décrite dans l'Exemple 1.

Le mélange obtenu par la méthode décrite dans l'Exemple 1 est dissous dans une eau distillée exempte de pyrogène en proportion de 10 mg de produit par ml d'eau. La solution ainsi obtenue subit une ultrafiltration moléculaire à travers une membrane ayant une limite d'exclusion moléculaire de 200 000 avec une technique de concentration et sans addition d'eau sur la membrane. Durant le processus de filtration à travers les membranes ayant une limite d'exclusion de 200 000, les molécules ayant un poids moléculaire supérieur à 200 000 ne passent pas tandis que les molécules plus petites passent à travers la membrane en même temps de l'eau. Pendant le processus de filtration, on n'ajoute pas d'eau dans le compartiment situé au-dessus de la membrane; de ce fait, le volume dans ce compartiment diminue et il se produit en même temps une augmentation de la concentration des molécules ayant un poids moléculaire supérieur à 200 000. On procède alors à une ultrafiltration jusqu'à ce que le volume sur la membrane soit réduit à 10% du volume initial. Deux volumes d'eau bi-distillée exempte de pyrogène sont ajoutés et la solution est, de nouveau, ultrafiltrée jusqu'à ce que le

volume soit réduit à un tiers. L'opération est répétée encore deux fois.

La solution qui passe à travers la membrane est portée à 1,0M avec du chlorure de sodium et elle est ensuite précipitée avec quatre volumes d'éthanol à 95%. Le précipité est lavé trois fois avec de l'éthanol à
5 75% et est ensuite séché sous vide.

Le produit ainsi obtenu (fraction de hyalastine) a un poids moléculaire moyen compris entre 50 000 et 100 000.

Le rendement en acide hyaluronique est égal à 0,4% du tissu frais original.

10 EXEMPLE 3 - Méthode d'obtention de la fraction de hyalectine.

La solution concentrée, rassemblée dans un récipient à partir de la membrane d'ultrafiltration ayant une limite d'exclusion moléculaire de 200 000 décrite dans l'Exemple 2, est diluée avec de l'eau jusqu'à ce que l'on obtienne une solution contenant 5 mg/ml d'acide hyaluronique
15 telle que déterminée par une analyse quantitative basée sur un essai de l'acide glycuronique.

La solution est portée à 0,1M dans le chlorure de sodium et elle est ensuite précipitée avec 4 volumes d'éthanol à 95%. Le précipité est lavé trois fois avec de l'éthanol à 75% et il est ensuite séché sous
20 vide.

Le produit ainsi obtenu (fraction de hyalectine) a un poids moléculaire moyen compris entre 500 000 et 730 000. Ceci correspond à une fraction d'acide hyaluronique spécifique ayant une longueur de chaîne moléculaire définie d'environ 250 000 à 350 000 motifs saccha-
25 rides avec un degré de pureté élevé.

Le rendement en acide hyaluronique est égal à 0,2% du tissu frais original.

EVALUATION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE ET PHARMACOLOGIQUE

30 1.- Activité biologique de la mobilisation cellulaire des fractions d'acide hyaluronique

La méthode consistant en la détermination de l'activité de détachement des fibroblasts dans une culture, est utilisée comme méthode d'évaluation de l'activité de mobilisation des cellules des fractions de HA.

35 Des cellules de souris BALB 3T3 sont cultivées sur un milieu de Dulbecco modifié Eagle avec du sérum de veau à 10%, de la pénicilline (250 unités/ml) et de la streptomycine (0,25 mg/ml), et elles sont incubées dans 5% de CO₂ humidifié, 95% d'air à 37°C. A des fins expéri-

mentales, des cellules sont inoculées de façon classiques dans des boîtes de culture de tissu en plastique d'un diamètre de 60 mm (6×10^5 cellules/boîte).

Des monocouches confluentes de cellules 3T3 sont décantées et l'on ajoute du milieu frais contenant 2,0 mg/ml de différentes fractions de HA. A des intervalles fixes, le détachement des cellules est observé à la fois au microscope et par comptage des cellules mobilisées dans un compteur de Coulter.

Essais de détachement

Pour mesurer la cinétique du détachement, des cellules sont inoculées dans des boîtes de plastique et on les laisse se développer pendant 24 heures. Après ce laps de temps, le milieu de culture est décanté et du milieu frais contenant 2,0 mg/ml de HA est ajouté. Toutes les 24 heures, deux boîtes, une de culture test et une de culture témoin, sont décantées et à la fois les cellules se trouvant dans le surnageant et les cellules liées sont comptées dans un compteur de Coulter. Le tableau 3 donne les résultats obtenus avec des test utilisant les fractions obtenues dans les exemples de préparation 1 à 3 ci-dessus.

20

TABLEAU 3

Résultats des études de mobilisation

Fraction	Concentration (mg/ml)	Nombre de cellules détachées par comparaison avec les témoins	% d'efficacité (par comparaison avec les témoins)
témoin		2×10^6	
hyalectine+hyalastine	2	$3,5 \times 10^6$	75
hyalectine	2	$2,1 \times 10^6$	5
hyalastine	2	5×10^6	150

Les données indiquées sur le tableau 3 montrent que la fraction de hyalastine manifeste une activité de mobilisation de cellules élevée ce qui rend cette fraction utile aux applications de cicatrisation des plaies. Cette activité de mobilisation des cellules de la hyalastine stimule la migration et la prolifération des nouvelles cellules lorsqu'une préparation pharmaceutique de la fraction est appliquée à une zone de tissu endommagée.

35

La fraction de hyalectine manifeste une activité très limitée de mobilisation des cellules et elle n'est donc par conséquent pas utile pour la cicatrisation des plaies. Cependant, la hyalectine, à cause de son poids moléculaire moyen élevé et de sa viscosité inhérente, est
5 utile pour les injections oculaires et intra-articulaires, et le manque d'activité appréciable de mobilisation des cellules est une caractéristique importante de la fraction d'hyalectine qui la rend spécialement utile pour les injections intra-oculaires et intra-articulaires.

2.- Activité inflammatoire biologique des fractions d'acide hyaluronique

10 Pour cette évaluation, on utilise la méthode du comptage des cellules envahissantes après administration intra-oculaire chez le lapin.

Méthode

Cinq (5) lapins de Nouvelles Zélandes ou de Californie pesant
15 environ 2 kg, ayant une vision considérée comme parfaite, sont utilisés pour ce test. L'extérieur de l'oeil des lapins est vérifié pour les processus inflammatoires au niveau macroscopique et l'intérieur de l'oeil est vérifié à l'ophtalmoscope. Si le fond de l'oeil est clairement visible et normal, le test peu avoir lieu.

20 Les animaux sélectionnés subissent une anesthésie locale par instillation de quelques gouttes d'un anesthésique stérile convenant en ophtalmologie, on instille également quelques gouttes d'atropine en solution ophtalmologique.

Le test est mis en oeuvre dans des conditions stériles. On fait
25 ressortir le globe oculaire en exerçant une pression jusqu'à ce qu'il soit possible d'injecter, à travers la sclérotique à environ 5 à 6 mm du bord de la cornée, au centre de l'humeur vitrée, 100 µl de la solution à l'aide d'une aiguille de 26G. L'autre oeil est pris comme témoin. On instille deux gouttes de solution d'antibiotique dans l'oeil traité et
30 les animaux sont alors placés seuls dans des cages.

Après 50 à 60 heures, le test peut continuer. Les yeux sont
vérifiés de la même façon que ci-dessus pour la sélection des animaux. Les animaux sont sacrifiés avec une injection intra-veineuse de pentothal. Ensuite, l'humeur aqueuse est, tout d'abord, recueillie (environ
35 0,2 ml) au moyen d'une seringue à insuline avec une aiguille 26G. Les globes oculaires sont ensuite énuclés, débarrassés de toute matière étrangère, lavés dans une solution saline, séchés sur papier, incisés et ouverts dans des boîtes de Pétri; on sépare la partie principale de

l'humeur vitrée et on la rassemble avec une seringue stérile (environ 0,7 ml). L'humeur vitrée est placée dans des petits tubes à essai de poléthylène et l'on ajoute 50 µl de hyaluronidase (100 U NF/ml). Le mélange est alors maintenu à une température de 37°C pendant environ 5 3 heures pour rendre la solution moins visqueuse.

Un comptage de leucocytes est effectué au microscope à contraste de phase (120 X) dans une chambre de Burker. Une série de comptage est effectuée sur chaque échantillon, on calcule les valeurs moyennes et l'on exprime le résultat en nombre de leucocytes par mm³.

10 Le test est considéré comme positif lorsque:

- 1.- les yeux examinés ne montrent pas de signe de dommage, et
- 2.- le nombre moyen de leucocytes provenant d'au moins quatre des cinq yeux traités n'excède pas 200 par mm³ et le nombre moyen de leucocytes provenant de chaque oeil témoin n'excède pas 50 par mm³.

15

Le tableau 4 indique les résultats obtenus à partir de cette évaluation en utilisant les fractions de HA obtenues dans les exemples de préparation 1 à 3 discutés ci-dessus.

TABLEAU 4

20

Résultats des études d'activité inflammatoire

<u>Fraction</u>	<u>Nombre de cellules envahissantes</u>
. témoin	25
25 . hyalastine + hyalectine	32
. hyalastine	20
. hyalectine	22
. fraction inflammatoire (PM moyen de 30 000)	150
30 . acide hyaluronique total provenant de crêtes de coqs (RF. Swann D.A. 1968, B.B.A. 156, 17-29)	120

Les résultats indiqués sur le tableau 4, indiquent que les frac-
35 tions de hyalastine et de hyalectine ne manifestent pas d'activité inflammatoire supérieure à celle du témoin et la fraction combinée de hyalastine et hyalectine montre seulement une augmentation négligeable de l'activité inflammatoire par rapport au témoin. Par conséquent, les

fractions de hyalastine et hyalectine sont pharmaceutiquement utiles sans manifester d'effets secondaires inflammatoires indésirables. Ces résultats confirment, également, encore la découverte de la demanderesse que c'est la fraction de HA ayant un poids moléculaire moyen faible
5 inférieur à 30 000 qui est responsable de l'activité inflammatoire des préparations de HA. L'acide hyaluronique provenant des crêtes de coqs préparées selon la méthode décrite dans la littérature par Swann (Swann D.A., 1968, B.B.A. 156, 17-29) présente une remarquable activité inflammatoire.

10 Il a été ainsi démontré que la fraction de hyalastine ayant un poids moléculaire moyen d'environ 50 000 à 100 000 manifeste une activité de mobilisation des cellules élevée et qu'elle est, par conséquent, utile dans les applications de cicatrisation des plaies sans manifester de réactions inflammatoires indésirables. La fraction de hyalectine
15 ayant un poids moléculaire moyen d'environ 500 000 à 730 000 a été démontrée comme étant utile pour faire des injections oculaire et intra-oculaires à cause de son poids moléculaire élevé et de sa viscosité inhérente et parce que, en même temps, elle ne stimule pas l'activité de mobilisation des cellules ou les réactions inflammatoires qui
20 sont des effets secondaires indésirables à éviter dans ces applications pharmaceutiques.

Plus spécifiquement, on a trouvé que la fraction de hyalastine était utile comme préparation de cicatrisation des plaies à cause des caractéristiques suivantes:

- 25 1. la préparation favorise un temps de cicatrisation remarquablement raccourci par comparaison aux thérapeutiques classiques, l'assainissement de la zone affectée étant rapide, une régularisation des bordures des ulcères, un développement vigoureux des tissus de granulation, une activation de la
30 migration cellulaire des macrophages et des fibroblasts et une épithélisation précoce.
2. la préparation favorise une préparation accélérée de la chirurgie reconstructive dans les cas plus sévères.
- 35 3. absence de formation de kéloïde ou de cicatrice de rétraction avec remise en forme finale du tissu cicatriciel procurant de bons résultats esthétiques et fonctionnels.

On a trouvé que la préparation de hyalastine était utile pour le traitement de diverses plaies, y compris les escarres de décubitus

(escarres de lits), ulcères trophiques, brûlures, plaies atones, ulcères post-traumatiques, ulcères variqueux et ulcères post-phlébitiques à la suite de diverses tâches veineuses, nécroses radiologiques, lésions de la peau, greffes de peau et lésions de la peau dues à l'herpès simplex.

5 Pour ces traitements de cicatrisation des plaies, la préparation de hyalastine ou son sel de sodium peut être administrée par différentes méthodes telles que tampon de gaz, crème, pulvérisation ou ampoules pour injection intradermique. Pour les applications topiques sous la forme de

10 crème ou d'un tampon de gaz, la hyalastine est, de préférence, combinée avec un agent émulsionnant qui absorbe l'exsudat provenant de la zone exposée tout en procurant une excellente diffusion de l'acide hyaluronique et un excipient dispersible dans l'eau de telle sorte que le pansement de la plaie s'enlève facilement.

La fraction de hyalectine a été trouvée particulièrement utile

15 pour le traitement des chevaux, particulièrement des chevaux de course souffrant de désordres et de maladies articulaires causés par un traumatisme aigu ou chronique, des infections ou des injections de corticostéroïde intra-articulaires répétées. Des désordres spécifiques que l'on peut traiter avec la hyalectine sont, par exemple, les ostéoarthroses

20 avec ou sans signes inflammatoires, la synorithe aiguë ou chronique, les processus dégénératifs dans les cartilages articulaires et les maladies articulaires sèches. Les symptômes les plus fréquents de ces désordres sont, généralement, une douleur, une fonction endommagée de l'articulation et une flexion diminuée de l'articulation. On a trouvé que la

25 fraction de hyalectine selon l'invention favorisait une réduction notable du temps de cicatrisation pour ces chevaux affectés par comparaison aux thérapeutiques classiques, favorisant une amélioration précoce et durable du fonctionnement des articulations et réduisant la douleur et l'infirmité. On pense que ces effets cliniquement avantageux

30 sont favorisés par une normalisation de la visco-élasticité du fluide synovial et par l'activation des processus de réparation des tissus dans les cartilages articulaires.

En outre, tous les effets avantageux ci-dessus sont favorisés par la fraction de hyalectine en l'absence d'effets toxiques, locaux et/ou

35 systémiques. Une administration répétée de hyalectine ne donne pas de signe de réaction allergique ni d'aucun effet nocif ou durable.

Préparations pharmaceutiques

La description ci-dessus a montré que les fractions de hyalastine

et de hyalactine avaient une bonne activité en applications pharmaceutiques. Les exemples suivants ne sont donnés que pour décrire des préparations pharmaceutiques susceptibles d'être employées pour une administration in vivo efficace des fractions de HA.

5 A.- Préparations de cicatrisation des plaies

Exemple 1 : ampoules pour injection intradermique :
chaque ampoule contient :

	. sel de sodium de hyalastine ..	4 mg
	. chlorure de sodium	16 mg
10	. eau pour injection, q.s.p. ...	2 ml

Exemple 2 : ampoules pour injection intradermique :
chaque ampoule contient :

	. sel de potassium de hyalastine	5 mg
	. chlorure de sodium	8 mg
15	. eau pour injection, q.s.p.	1 ml

Exemple 3 : bouteille de pulvérisation pour application topique
chaque bouteille contient :

	. sel de sodium de hyalastine ..	20 mg
	. chlorure de sodium	80 mg
20	. eau pour injection, q.s.p. ...	10 ml

Exemple 4 : bouteille de pulvérisation pour application topique
chaque bouteille contient :

	. sel de potassium de hyalastine	30 mg
	. mannitol	100 mg
25	. eau pour injection, q.s.p. ...	10 ml

Exemple 5 : crème pour application topique
chaque tube de crème contient :

	. sel de potassium de hyalastine	25 mg
	. monostéarate de polyéthylène- glycol 400	1000 mg
30	. cétiole (ester décylique de l'acide oléique)	500 mg
	. lanette SX (alcool cétyl- stéarique + laurylsulfate 9/1)	150 mg
35	. glycérol	200 mg
	. sorbitol	150 mg
	. déhydroacétate de Na	10 mg
	. p-oxyméthylbenzoate	7,5 mg

		. p-oxypropylbenzoate	5 mg
		. eau redistillée, q.s.p.	10 g
	<u>Exemple 6</u> :	crème pour application topique	
		chaque tube de crème contient :	
5		. sel de sodium de hyalastine ..	30 mg
		. gelée de paraffine	3 mg
		. monostéarate de polyéthylène- glycol 400	1000 mg
10		. cétiole (ester décylique de l'acide oléique)	500 mg
		. lanette SX (alcool cétyl- stéarique + laurylsulfate 9/1)	150 mg
		. glycérol	200 mg
		. sorbitol	150 mg
15		. déhydroacétate de Na	10 mg
		. p-oxyméthylbenzoate	7,5 mg
		. p-oxypropylbenzoate	5 mg
		. eau redistillée, q.s.p.	10 g
	<u>Exemple 7</u> :	tampon de gaz contenant des médicaments pour	
20		application topique, chaque tampon de gaz mesurant	
		10 x 10 cm, contient :	
		. sel de sodium de hyalastine ..	3 mg
		. glycérol	1 g
		. polyéthylèneglycol	2 g
25		. eau redistillée, q.s.p.	3 g
	<u>Exemple 8</u> :	tampon de gaz chargé de médicament pour application	
		topique, chaque tampon de gaz mesurant 10 x 10 cm,	
		contient :	
		. sel de potassium de hyalastine	6 mg
30		. gelée de paraffine	0,5 mg
		. glycérol	1 g
		. polyéthylèneglycol	2 g
		. eau redistillée, q.s.p.	3 g
	<u>Exemple 9</u> :	poudre sèche pour application en cicatrisation des	
35		plaies -	
		chaque gramme de poudre sèche contient:	
		. sel de sodium de hyalastine ..	10 mg
		. mannitol	0,75 g

		. glycine	0,24 g
B.-	<u>Préparations pour utilisation intra-oculaire</u>		
	<u>Exemple 10</u> : fioles de 1 ml -		
	chaque fiole contient:		
5		. sel de sodium de hyalectine ..	10 mg
		. chlorure de sodium	8 mg
		. phosphate de sodium monobasi- que 2H ₂ O	0,25 mg
10		. phosphate de sodium dibasi- que 12H ₂ O	3 mg
		. eau pour injection, q.s.p. ...	1 ml
	<u>Exemple 11</u> : fioles de 5 ml -		
	chaque fiole contient:		
15		. sel de potassium de hyalectine	60 mg
		. mannitol	50 mg
		. phosphate de sodium monobasi- que 2H ₂ O	1,25 mg
		. phosphate de sodium dibasi- que 12H ₂ O	15 mg
20		. eau pour injection, q.s.p. ...	5 ml
	<u>Exemple 12</u> : seringues pré-remplies -		
	chaque seringue contient:		
		. sel de sodium de hyalectine ..	40 mg
		. chlorure de sodium	16 mg
25		. phosphate de sodium monobasi- que 2H ₂ O	0,8 mg
		. phosphate de sodium dibasi- que 12H ₂ O	8,16 mg
		. eau pour injection, q.s.p. ...	2 ml
30	C.-	<u>Préparations pour utilisation intra-articulaire</u>	
		<u>Exemple 13</u> : fioles de 2 ml -	
		chaque fiole contient:	
		. sel de sodium de hyalectine ..	40 mg
		. chlorure de sodium	16 mg
35		. eau pour injection, q.s.p. ...	2 ml
		<u>Exemple 14</u> : fioles de 4 ml -	
		chaque fiole contient:	
		. sel de potassium de hyalectine	60 mg

. mannitol	35 mg
. glycine	10 mg
. eau pour injection, q.s.p. ...	4 ml

Exemple 15 : seringues pré-remplies -

5	chaque seringue contient:	
	. sel de sodium de hyalectine ..	25 mg
	. chlorure de sodium	12 mg
	. mannitol	10 mg
10	. phosphate de sodium monobasi- que 2H ₂ O	0,5 mg
	. phosphate de sodium dibasi- que 12H ₂ O	6 mg
	. eau pour injection, q.s.p. ...	2 ml

Bien que les préparations ci-dessus aient été décrites à titre
15 d'exemples, on comprendra que d'autres formulations pharmaceutiques
peuvent se préparer en combinant les fractions de hyalastine et de
hyalectine découvertes par la demanderesse ou leurs sels de potassium ou
de sodium avec d'autres véhicules pharmaceutiquement acceptables,
diluants ou excipients et, à diverses doses, en fonction de l'utilisa-
20 tion particulière de la formulation.

Pour des utilisations de cicatrisation des plaies, les prépara-
tions de fractions de hyalastine sont appliquées aux zones de la peau
affectées sous une des formes de dosage discutées ci-dessus, c'est-à-
dire soit sous forme de crème, de pulvérisation, de tampon de gaz, de
25 poudre sèche ou d'injection intradermique. Pour des utilisations intra-
articulaires, les préparations de hyalectine sont généralement adminis-
trées à une dose de 2 ml par articulation, soit à partir d'une fiole
préparée, soit à partir d'une seringue pré-remplie comme décrit ci-
dessus.

30 Dans une étude supplémentaire, on a examiné la capacité et l'effi-
cacité de l'acide hyaluronique comme véhicule de diverses molécules, en
particulier comme véhicule de drogues ophtalmiques, garantissant une
tolérabilité et une compatibilité parfaites (c'est-à-dire absence de
phénomène de sensibilisation) avec l'épithélium cornéen. On considère
35 que l'acide hyaluronique a un intérêt particulier comme véhicule ophtal-
mique. Comme discuté ci-dessus, le HA est un glycosaminoglycane
présent dans divers tissus conjonctifs et liquides biologiques (tel que
le fluide synovial et, en particulier, l'humeur vitreuse) où à cause de

sa nature physique et chimique et de ses caractéristiques visco-élastiques frappantes, il joue un rôle structural et biologique d'une importance fondamentale.

Ainsi, on a conduit une étude pour examiner l'utilisation de
5 fraction de HA ayant différents poids moléculaires, notamment les fractions de hyalastine et de hyalectine et un mélange de celles-ci pour la préparation de diverses formes pharmaceutiques telles que collyres, gels, crèmes, inserts ou poudres sèches. De ce fait, des médicaments ophtalmiques de différents types sont étudiées en vue d'obtenir une
10 large compréhension de l'utilisation potentielle de ce polymère biologique dans ces différentes fractions en tant que véhicule.

Les expériences décrites ci-après visent à déterminer si des formulations contenant de l'acide hyaluronique comme excipient sont capables d'améliorer la disponibilité biologique des médicaments véhiculés ou de produire un effet cynergique en combinaison avec les médicaments véhiculés, notamment avec les médicaments ayant une activité ou une utilité ophtalmique. Ces capacités potentielles de HA comme véhicule sont étudiées dans l'oeil du lapin avec quatre médicaments ophtalmiques ayant des types et des actions différents, en particulier le nitrate de
20 pilocarpine, la triamcinolone, le facteur de croissance épidermique (EGF) et un antibiotique tel que la streptomycine et la gentamicine. Tous ces médicaments sont connus pour avoir une efficacité myotique anti-inflammatoire cicatrisante et anti-microbienne. En outre, l'évaluation de l'activité de l'antibiotique streptomycine véhiculé par l'acide
25 hyaluronique est très importante, parce que c'est l'un des antibiotique les plus largement utilisé dans les infections oculaires.

Les modèles expérimentaux étudiés et les expériences effectuées sont les suivantes:

- 1) activité myotique du nitrate de pilocarpine véhiculé par
30 l'acide hyaluronique dans l'oeil du lapin;
- 2) activité anti-inflammatoire de la triamcinolone véhiculé par l'acide hyaluronique dans le modèle de l'inflammation induite par le textrane dans l'oeil du lapin;
- 3) activité cicatrisante du facteur de croissance de l'épiderme
35 (EGF) véhiculé par l'acide hyaluronique dans un modèle de lésion épithélienne de cornée du lapin;

- 4) activité anti-microbienne de la streptomycine véhiculé par l'acide hyaluronique contre le Bacillus subtilus 6633 sur des plaques d'agar-agar.

I.- Activité myotique du nitrate de pilocarpine véhiculé par l'acide

5 hyaluronique

Matières

Les matières suivantes sont utilisées comme excipients de la pilocarpine pour les diverses formulations de nitrate de pilocarpine:

- 10 - sel de sodium de l'acide hyaluronique, fraction de hyalastine (p.m. approximativement 100 000) à une concentration de 10 mg/ml et 20 mg/ml;
- sel de sodium de l'acide hyaluronique, fraction de hyalectine (p.m. 500 000 à 730 000) à une concentration de 10 mg/ml et 20 Mg/ml;
- 15 - alcool polyvinylique à 5% comme excipient ophtalmique comparatif.

Diverses formulations à 2% (collyre ou gel) de nitrate de pilocarpine sont préparées et véhiculées en ajoutant les deux fractions différentes de sels de sodium de HA à une concentration de 10 et 20 ml/ml. Les solutions suivantes sont préparées:

- 20 Formulation 1 - solution saline avec nitrate de pilocarpine (PiNO_3) (2%), utilisée comme référence.

Formulation 2 - solution de PiNO_3 (2%) véhiculée dans de l'alcool polyvinylique à 5% (utilisée comme référence).

- 25 Formulation 3 - solution de PiNO_3 (2%) véhiculée dans du sel de sodium de la fraction de hyalastine (10 mg/ml).

Formulation 4 - solution de PiNO_3 (2%) véhiculée dans du sel de sodium de la fraction de hyalastine (20 mg/ml).

Formulation 5 - solution de PiNO_3 (2%) véhiculée dans du sel de sodium de la fraction de hyalastine (10 mg/ml).

- 30 Formulation 6 - solution de PiNO_3 (2%) véhiculée dans du sel de sodium de la fraction de hyalastine (20 mg/ml).

Méthode

Des lapins albinos de Nouvelle Zélande sont utilisés (poids 2 à 2,5 kg). La formulation à tester est instillée dans un oeil avec une micro-seringue (10 l); l'autre oeil sert de témoin. Dans tous les cas, on mesure le diamètre de la pupille à des intervalles de temps convenable. Chaque solution est testée sur au moins 8 lapins. Chaque oeil

n'est pas traité plus de trois fois et une période de repos d'au moins une semaine est observée entre chaque traitement.

Paramètres mesurés

Les diamètres de pupilles sont mesurés à divers intervalles en vue de déterminer la courbe d'activité myotique dans le temps. Les paramètres d'activité suivants sont ensuite calculés à partir de la courbe myosis/temps:

I_{\max} = différence maximum de diamètre de la pupille entre l'oeil traité et la référence.

10 Temps de pic = temps nécessaire pour atteindre I_{\max} .

Durée = temps nécessaire pour restaurer les conditions de base.

Plateau = période d'activité myotique absolue.

AUC = zone sous myosis/courbe de temps.

Résultats

15 Les résultats des tests sont indiqués sur le tableau 5. On peut voir, d'après les données des divers paramètres mesurés à partir de la courbe de temps d'activité myotique pour toutes les solutions testées que l'addition d'acide hyaluronique à une solution de nitrate de pilocarpine à 2% donne lieu à une augmentation de l'activité myotique du médicament. En fait la disponibilité biologique du médicament peut être 20 jusqu'à 2,7 fois plus importante que celle de la solution aqueuse contenant du nitrate de pilocarpine à 2% (formulation 1).

On doit aussi noter qu'il y a une augmentation statistique significative d'activité lorsque la fraction de hyaléctine et la fraction 25 d'acide hyaluronique sont utilisées toutes les deux à 10 et 20 mg/ml comme véhicules (formulations 5 et 6), au contraire de la solution de nitrate de pilocarpine véhiculée par l'alcool polyvinylique (formulation 2).

L'utilisation de l'acide hyaluronique comme véhicule est particulièrement intéressante parce que l'activité myotique du nitrate de 30 pilocarpine dure plus longtemps lorsqu'elle est véhiculée avec cette substance. C'est-à-dire, que pour les formulations contenant l'acide hyaluronique, le temps nécessaire pour restaurer le diamètre de la pupille aux conditions de base va jusqu'à 190 minutes (formulation 6) 35 par comparaison avec les 110 minutes nécessaires pour la pilocarpine avec une solution saline seule (formulation 1).

II.- Activité anti-inflammatoire de la triamcinolone véhiculée par l'acide hyaluronique

Matières

On utilise les matières suivantes:

- 5 - une fraction de sel de sodium d'acide hyaluronique-hyalectine, p.m. entre 500 000 et 730 000, 10 mg/ml dans une solution saline:
- solution de triamcinolone (10% dans une solution saline).

Méthode

Les expériences sont effectuées sur des lapins mâles de Nouvelle
10 Zélande (poids moyen 1,6 kg). Après une période d'adaptation de cinq jours, l'inflammation intra-oculaire est induite dans les lapins par injection intra-oculaire de dextrane (10%, 0,1 ml). L'administration est effectuée dans les deux yeux, sous anesthésie locale avec de la Novésina à 4%, en insérant l'aiguille de la seringue de 4 mm dans la
15 chambre antérieure à une distance de 2 mm du pourtour de la cornée. Le test est conduit sur dix animaux.

TABLEAU 5

20 Activité biologique de formulations ophtalmiques contenant pilocarpine-nitrate véhiculé par l'acide hyaluronique^a

Formu- lation	véhicule	I _{max} , nm (à LF 95%)	temps de pic (en mn)	durée (en mn)	plateau (en mn)	AUC, cm ² (± LF 95%)	AUC relative
25	1 solution saline	1,93 ± 0,35	20	110	-	117 ± 28	1
	2 alcool polyviny- lique à 5%	2,33 ± 0,28	20	140	-	192 ± 32	1,64
	3 hyalastine (10mg/ml)	2,50 ± 0,42	20	120	-	240 ± 40	2,05
	4 hyalastine (20mg/ml)	2,58 ± 0,38	30	150	-	208 ± 41	1,78
30	5 hyalectine (10mg/ml)	2,50 ± 0,38	15	170	-	242 ± 48	2,06
	6 hyalectine (20mg/ml)	2,10 ± 0,38	20	190	45	320 ± 45	2,73

^a les valeurs indiquées représentent la valeur moyenne de huit essais.

Traitement

Un traitement est effectué sur chaque animal, à la fois dans l'oeil droit et dans l'oeil gauche par instillation de trois gouttes, trois fois par jour pendant six jours en tout de ce qui suit:

- 5 - une solution de triamcinolone (10% dans une solution saline) dans l'oeil gauche (LE);
- une solution de sel de sodium d'acide hyaluronique, fraction de hyalectine, (10 mg/ml) + triamcinolone (10%) dans l'oeil droit (RE);

10 Paramètres

L'effet anti-inflammatoire sur la réaction phlogistique induite par le dextrane est évalué en observant l'oeil avec une lampe fendue aux intervalles suivants: 0, 1 heure, 3 heures, 24 heures, 48 heures, 3 jours, 4 jours, 5 jours et 6 jours.

- 15 A ces intervalles, l'examen de l'oeil conduit aux observations suivantes:

- l'état de la cornée et de la conjonctive pour déceler la présence possible d'hypermia, oedème et notamment observation de l'iris qui est normalement sensible au processus phlogistique après injection intra-oculaire d'agents inflammatoires;
- 20 - effet Tyndall dans lequel la présence d'une opacité plus ou moins intense ("nubecula") est indicative de la présence d'éléments corpusculents (inflammatoire) dans la chambre antérieure.

Le résultat des observations est exprimé en termes de notations subjectives (de 0 à 3) liées à la progressivité de l'effet observé.

25

Résultats

On peut voir, d'après les résultats reportés dans le tableau 6 que l'administration de la triamcinolone a un effet anti-inflammatoire sur l'iris et occasionne la disparition de l'opacité (effet Tyndall) dans la chambre antérieure. Le processus inflammatoire qui est évident à partir de la première à la troisième heure jusqu'au quatrième jour décroît progressivement jusqu'à ce que des conditions sensiblement normales soient rétablies avec une limpidité parfaite de l'oeil le sixième jour. D'autre part, l'administration du sel de sodium de l'acide hyaluronique, fraction hyalectine, en même temps que la triamcinolone réduit l'inflammation intra-oculaire observée au moment discuté ci-dessus par rapport à l'administration de la triamcinolone seule. C'est-à-dire que le processus phlogistique dans l'iris et l'opacité dans la chambre anté-

30

35

rieure semblent avoir diminués à la 24ème heure, avec une réduction progressive jusqu'à la 48ème heure et avec une absence totale de réaction inflammatoire à partir du 4ème jour.

Dans la conjonctive et la cornée, on n'observe sensiblement pas de réaction notoire après injection intra-oculaire de dextrane.

Ainsi, l'administration de triamcinolone, en même temps que de la fraction d'acide hyaluronique conduit à une activité améliorée du médicament, ce que met en évidence la cicatrisation plus rapide de l'oeil du lapin.

10

TABLEAU 6

Effet de la combinaison de l'acide hyaluronique et de la triamcinolone sur l'inflammation intra-oculaire induite par le dextrane

	Interval d'observation																	
	0		1 h		3 h		24 h		48 h		3 j		4 j		5 j		6 j	
	notation évaluée ^a																	
	LE	RE	LE	RE	LE	RE	LE	RE	LE	RE	LE	RE	LE	RE	LE	RE	LE	RE
20 conjonctive	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
cornée	0,0	0,0	1,0	0,2	0,0	0,7	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tyndall	0,0	0,0	1,0	1,2	3,0	3,0	3,0	2,1	3,0	1,2	3,0	0,2	2,2	0,0	1,2	0,0	0,4	0,0
Iris	0,0	0,0	0,5	0,7	2,7	2,7	3,0	2,5	3,0	1,2	3,0	0,4	2,4	0,0	1,5	0,0	0,5	0,0
25	LE = oeil gauche traité avec la triamcinolone.																	
	RE = oeil droit traité avec la triamcinolone et la hyalectine.																	
30	^a chaque valeur est la moyenne de sept observations sur un total de sept animaux et elle est exprimée en termes de notation subjective entre 0 et 3, en relation avec la progressivité de l'effet observé.																	

III.- Activité de cicatrisation du EGF véhiculé dans l'acide hyaluronique

Matières

35 On utilise les matières suivantes:

Formulation A - EGF (facteur de croissance épidermique) dissous dans une solution saline (0,5 mg/5 ml).

Formulation B - sel de sodium d'acide hyaluronique, fraction hyalastine (p.m. approximativement 100 000) dissous dans une solution saline (10 mg/ml).

Méthodes

5 Les expériences sont menées sur des lapins mâles albinos de Nouvelles Zélandes (poids moyen 1,8 kg). Les animaux, après une période d'adaptation environ 5 jours, subissent une lésion épithélienne de la cornée dans les conditions convenables d'anesthésie locale avec la Novésina (4%). La lésion consiste en une scarification monoculaire d'une
10 zone circulaire de la zone optique effectuée par un cylindre de verre concave (3 mm) ayant un bord coupant.

Traitement

Les animaux sont subdivisés en groupes, chaque groupe étant constitué de cinq animaux et ils sont soumis à un traitement pharmacologique par instillation dans la conjonctive de ce qui suit:
15

<u>Groupes</u>	<u>Traitement</u>
20 groupe 1 (témoin) groupe 2 groupe 3	25 solution saline solution EGF (formulation A) solution de sel de sodium d'acide hyaluronique, fraction de hyalastine + solution d'EGF - combinaison de formulation A + formulation B dans un rapport 1/1, pour obtenir une formulation C

Le traitement est effectué sur l'oeil droit (RE) par instillation dans la conjonctive de deux gouttes toutes les huit heures pour trois
30 administrations au total.

Paramètres

La cicatrisation de l'épithélium cornéen est évaluée par observation de l'oeil et par documentation photographique avec une lampe fendue à divers intervalles après scarification: 0, 8 heures, 16 heures,
35 24 heures, 32 heures, 40 heures et 48 heures.

Résultats

L'examen ophtalmologique 1, tel qu'indiqué sur le tableau 7, révèle que pour les témoins (groupe 1) une cicatrisation complète est

obtenue (5 animaux sur 5) 48 heures après la lésion. Dans les animaux traités par EGF (groupe 2), le processus de cicatrisation est apparent déjà 24 heures après scarification avec une efficacité considérable (4 animaux sur 5). Chez les animaux traités avec la formulation C

5 comprenant le sel de sodium d'acide hyaluronique, fraction hyalastine + EGF (groupe 3), le processus de cicatrisation est complet chez tous les animaux (5 sur 5) déjà 16 heures après scarification.

Ces résultats montrent que l'utilisation de la hyalastine fraction d'acide hyaluronique comme véhicule pour l'EGF accélère le processus de

10 cicatrisation en favorisant une cicatrisation efficace plus rapide des lésions cornéenne.

TABLEAU 7
Guérison des lésions de l'épithélium cornéen

15	Groupe	Traitement	Heures après scarification				
			0	8	16	24	48
20	1	saline	+	+	+	+	-
			+	+	+	+	-
			+	+	+	+	-
			+	+	+	+	-
25	2	EGF (formulation A)	+	+	+	-	-
			+	+	+	-	-
			+	+	+	+	-
			+	+	+	-	-
30	3	acide hyaluronique + EGF (formulation C)	+	+	-	-	-
			+	+	-	-	-
			+	+	-	-	-
			+	+	-	-	-
35			+ = oeil non cicatrisé. - = oeil cicatrisé.				

IV.- Activité anti-microbienne de la gentamicine véhiculée par l'acide hyaluronique

Matières

On utilise les matières suivantes:

- 5 - gentamicine dissoute sans une solution saline (50 mg/ml);
 - sel de sodium d'acide hyaluronique, fraction hyalectine (2 mg/ml).

Méthodes

Une phlogose septique est causée dans chaque oeil de 11 lapins par injection intra-oculaire d'une suspension titrée de pseudomonas aeruginosa (0,1 ml). Chez les lapins présentant une phlogose septique, on administre de l'acide hyaluronique, fraction hyalectine en combinaison avec de la gentamicine par instillation dans l'oeil droit et de la gentamicine dans un véhicule constitué d'une solution saline tamponnée est administrée dans l'oeil gauche. Le traitement (trois gouttes toutes
 10 Les six heures) commence immédiatement après injection de l'agent infectant et on le poursuit jusqu'à ce que l'infection disparaisse. Les yeux sont observés tous les jours sous une lampe à fentes.

Résultats

Le traitement à l'aide de la combinaison gentamicine acide hyaluronique conduit à une disparition plus rapide de l'infection septique par comparaison avec le cas de l'administration de l'antibiotique seul.
 Cette conclusion apparaît d'après les données présentées sur le tableau 8.

TABLEAU 8

25 Effets de la gentamicine véhiculée par l'acide hyaluronique, fraction hyalectine sur la phlogose septique intra-oculaire

Traitement	jours à partir du début de la phlogose						
	1	2	3	4	5	6	7
30 gentamicine + véhicule tampon salin	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	36,3	100
gentamicine + fraction acide hyaluronique hyalectine	0,0	0,0	9,0+	27,2+	72,7+	100	100

35 Les valeurs sont exprimées en pourcentage (nombre d'yeux guéris de la phlogose par rapport au nombre d'yeux traités).

+ = différence significative par rapport au véhicule tampon (moins de 0,05, T-test exact de Fisher).

Des échantillons supplémentaires, bien que cette liste ne soit pas limitative, de médicaments ophtalmiques que l'on peut véhiculer avec des fractions de HA selon la présente invention, sont les suivants:

5	. antibiotiques	chloromphénicol néomycine auréomycine myxine et polymyxine bacitracine mycétines
10	. hormones	nandrolone et sulfate de nandrolone
	. anesthésiques (locaux)	hénoxinate et son chlorhy- drate
15	. antiviral	iodocéoxyuridine iodocéoxycytidine
	. anti-inflammatoires	dexaméthasone et son phosphate
	. vasopresseurs et vasoconstricteurs	synéphrine et néosynéphrine

CONCLUSIONS

20 Sur la base des résultats obtenus à partir des expériences discu-
tées ci-dessus, on peut conclure que des solutions de sels d'acide
hyaluronique, (à la fois dans les fractions hyalastine et hyalectine)
peuvent être utilisées comme véhicules pour des médicaments ophtalmiques
et s'avèrent être efficaces en tant que telles pour divers types de
25 médicaments ayant différentes actions biologiques. Par exemple, des
médicaments comprenant des agents anti-glaucomes tels que le nitrate de
pilocarpine, des agents anti-allergiques et anti-inflammatoires tels que
triamcinolone, des agents favorisant la cicatrisation des tissus et la
prolifération des cellules, des agents favorisant la cicatrisation des
30 tissus de l'oeil tels que EGF et des antibiotiques tels que streptomycine
et gentamicine dont on indique respectivement les activités myotiques
anti-inflammatoires, cicatrisantes et anti-microbiennes peuvent toutes
être administrées avec efficacité en utilisant le HA comme véhicule.

35 Les formulations de médicaments ophtalmiques véhiculés dans les
fractions d'acide hyaluronique ayant divers poids moléculaires sont
parfaitement tolérés par l'hôte et compatibles avec l'épithélium cornéen
sans donner lieu, cependant, à des phénomènes de sensibilisation.

Il est également possible, à partir des données, d'observer que ce

produit biologique, l'acide hyaluronique, est un véhicule efficace capable d'améliorer la disponibilité biologique in vivo des médicaments véhiculés, et de renforcer l'activité pharmacologique de ces médicaments. L'utilisation des fractions d'acide hyaluronique comme véhicule de médicaments a particulièrement comme résultats:

- une augmentation de l'activité myotique du nitrate de pilocarpine, tout en prolongeant le temps d'activité du médicament;
- une augmentation d'activité anti-inflammatoire de la triamcinolone dans l'inflammation intra-oculaire induite par le dextrane, avec une régression du processus phlogistique dans des temps plus courts que ceux que l'on obtient avec la triamcinolone seule;
- augmentation de l'action protectrice du facteur de croissance épidermique (EGF) sur les lésions superficielles de la cornée avec un synergisme évident et réduction des temps de cicatrisation par comparaison avec le temps de récupération observé avec l'EGF seul; et
- augmentation dans l'activité biologique in vivo des antibiotiques tels que la gentamicine.

Les résultats obtenus en utilisant ce polymère biologique, l'acide hyaluronique, comme véhicule pour des médicaments avec des effets de nature si diverses, permet l'extrapolation de son potentiel comme véhicule de nombreux autres médicaments ophtalmiques.

On indique, ci-dessous, divers exemples de diverses formulations de médicaments ophtalmiques pouvant se trouver sous la forme de poudres, collyres, gels, crèmes ou inserts, dans lesquels l'acide hyaluronique sous la forme de ces différentes fractions hyalastine et hyalectine est le seul excipient utilisé:

30 Exemple 1

Collyre pouvant être utilisé comme "larmes artificielles" contenant:

35	. sel de sodium d'acide hyaluronique, fraction hyalectine	10 mg
	. solution saline tamponnée avec du phosphate à pH,6	10 ml

Exemple 2

Collyre pouvant être utilisé comme "larmes artificielles" contenant:

5	. sel de sodium d'acide hyaluronique, fraction hyalectine	20 mg
	. solution saline tamponnée avec du phosphate à pH,6	10 mg

Exemple 3

Un gel contenant de l'EGF dans lequel 100 g contiennent:

10	. sel de sodium d'acide hyaluronique, fraction hyalastine	55 mg
	. sel de sodium d'acide hyaluronique, fraction hyalectine	30 mg
	. EGF	0,5 g
15	. eau bi-distillée	25,5 g

Exemple 4

Un insert de 100 mg avec du nitrate de pilocarpine contenant:

20	. sel de sodium d'acide hyaluronique, fraction hyalastine	100 mg
	. nitrate de pilocarpine	2 mg

Exemple 5

Une poudre pour application topique contenant de la streptomycine. 100 g de poudre contiennent:

25	. sel de sodium d'acide hyaluronique, fraction hyalastine	70 mg
	. sel de sodium d'acide hyaluronique, fraction hyalectine	28,5 mg
	. streptomycine	1,5 g

30 Bien que les préparations ci-dessus aient été données à titre d'exemple, on appréciera que les formulations pharmaceutiques peuvent se préparer en combinant les fractions hyaluroniques, notamment les fractions hyalectines ou hyalastines ou la fraction combinée hyalectine/hyalastine ou leurs sels de sodium ou de potassium avec d'autres médicaments actifs avec diverses doses en fonction de l'utilisation particulière de la formulation.

35 L'acide hyaluronique, notamment dans les fractions de hyalectine et hyalastine sensiblement pures a donc été démontré comme étant un véhicule ou excipient efficace utilisable en combinaison avec diverses

drogues médicaments ayant une utilité ou une activité ophtalmique. Les compositions pharmaceutiques contenant les fractions de HA comme véhicules de médicaments sont particulièrement utiles parce que les fractions de HA manifestent un niveau élevé de tolérabilité pour l'oeil et une compatibilité élevée avec l'épithélium cornéen.

L'utilisation des fractions de HA procure, en outre, un moyen d'améliorer effectivement l'activité biologique in vivo des médicaments ophtalmiques. L'utilisation des fractions particulières hyalectines et hyalastines du HA est, en outre, utile et importante parce que ces fractions, quand on les administre dans l'oeil ne manifestent pas de réactions secondaires inflammatoires indésirables.

15

20

25

30

35

REVENDICATIONS

1.- Procédé de préparation d'une fraction d'acide hyaluronique, sensiblement pure, non-inflammatoire, consistant:

- 5 - à déshydrater les tissus contenant une quantité disponible d'acide hyaluronique;
- à soumettre le tissu déshydraté qui en résulte à une digestion enzymatique;
- 10 - à soumettre le mélange qui en résulte à une filtration moléculaire pour obtenir une fraction d'acide hyaluronique ayant un poids moléculaire moyen d'environ 50 000 à environ 100 000, d'environ 250 000 à environ 350 000 ou d'environ 500 000 à environ 730 000.

2.- Procédé de préparation d'une fraction d'acide hyaluronique, sensiblement pure, non-inflammatoire, consistant:

- 15 - à déshydrater les tissus disponibles pour l'extraction de l'acide hyaluronique;
- à soumettre la substance qui en résulte à une digestion enzymatique;
- 20 - à soumettre le mélange qui en résulte à une filtration moléculaire avec une membrane ayant une limite d'exclusion de poids moléculaire de 30 000 pour exclure les molécules ayant un poids moléculaire supérieur à 30 000;
- 25 - à recueillir le mélange retenu dans cette membrane, pour obtenir ainsi une première fraction d'acide hyaluronique ayant un poids moléculaire moyen d'environ 250 000 à environ 350 000.

3.- Méthode de préparation d'une fraction d'acide hyaluronique, sensiblement pure, non-inflammatoire, selon la revendication 2, dans lequel cette première fraction d'acide hyaluronique est soumise à une

30 ultra-filtration moléculaire ultérieure avec une membrane ayant une limite d'exclusion de poids moléculaire d'environ 200 000 pour exclure les molécules ayant un poids moléculaire supérieur à 200 000, à poursuivre l'ultra-filtration jusqu'à ce que le volume du mélange soumis à l'ultra-filtration soit réduit à 10% du volume initial et à recueillir

35 le mélange qui passe à travers la membrane pour obtenir ainsi une seconde fraction d'acide hyaluronique ayant un poids moléculaire moyen d'environ 50 000 à 100 000.

4.- Procédé de préparation d'une fraction d'acide hyaluronique, sensiblement pure, non-inflammatoire, consistant à recueillir le mélange retenu sur la membrane après l'étape d'ultra-filtration avec une membrane ayant une limite d'exclusion de poids moléculaire d'environ
5 200 000 selon la revendication 3, pour obtenir ainsi une troisième fraction d'acide hyaluronique ayant un poids moléculaire moyen d'environ 500 000 à environ 730 000.

5.- Fraction d'acide hyaluronique, sensiblement pure, non-inflammatoire, ayant un poids moléculaire moyen compris entre 30 000 et
10 730 000 ou son sel de sodium ou de potassium.

6.- Fraction d'acide hyaluronique, sensiblement pure, non-inflammatoire selon la revendication 5, ayant un poids moléculaire moyen compris entre environ 250 000 et environ 350 000 ou son sel de sodium ou de potassium.

15 7.- Fraction d'acide hyaluronique, sensiblement pure, non-inflammatoire selon la revendication 5, ayant un poids moléculaire moyen compris entre environ 50 000 et environ 100 000 ou son sel de sodium ou de potassium de celle-ci.

20 8.- Fraction d'acide hyaluronique, sensiblement pure, non-inflammatoire selon la revendication 5, ayant un poids moléculaire moyen compris entre environ 500 000 et environ 730 000 ou son sel de sodium ou de potassium.

25 9.- Composition pharmaceutique contenant une quantité efficace en cicatrisation des plaies d'une fraction d'acide hyaluronique selon la revendication 6, et au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable, excipient ou diluant.

30 10.- Composition pharmaceutique contenant une quantité efficace en cicatrisation des plaies d'une fraction d'acide hyaluronique selon la revendication 7, et au moins un véhicule, excipient ou diluant pharmaceutiquement acceptable.

11.- Composition pharmaceutique contenant une quantité efficace en traitement intra-oculaire ou intra-articulaire d'une fraction d'acide hyaluronique selon la revendication 8, et au moins un véhicule, excipient ou diluant pharmaceutiquement acceptable.

35 12.- Composition pharmaceutique pour administration ophtalmique comprenant une quantité efficace d'une drogue ayant une activité ophtalmique comme ingrédient actif et véhicule support ou diluant pharmaceutiquement acceptable comprenant une fraction sensiblement pure d'acide

hyaluronique ou d'un de ses sels.

13.- Composition pharmaceutique selon la revendication 12, dans laquelle cette fraction d'acide hyaluronique a un poids moléculaire moyen d'environ 50 000 à environ 100 000, d'environ 250 000 à environ 5 350 000 ou d'environ 500 000 à environ 730 000.

14.- Composition pharmaceutique selon la revendication 12, dans laquelle cette fraction d'acide hyaluronique a un poids moléculaire moyen d'environ 50 000 à environ 730 000.

10

15

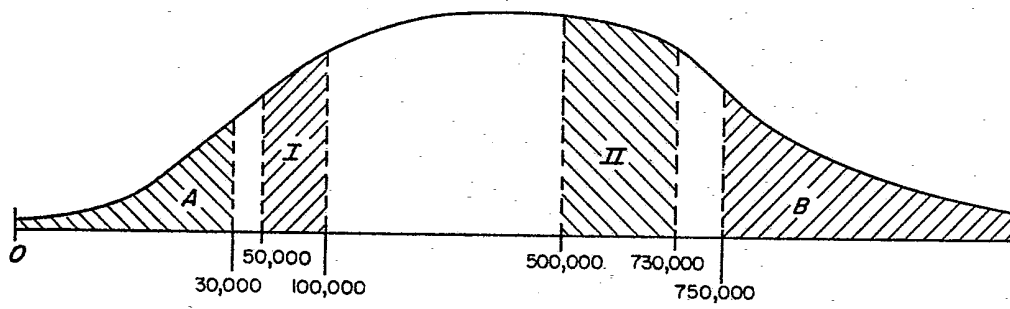
20

25

30

35

1/1



POIDS MOLECULAIRE MOYEN D'ACIDE
HYALURONIQUE