



Office de la Propriété
Intellectuelle
du Canada

Un organisme
d'Industrie Canada

Canadian
Intellectual Property
Office

An agency of
Industry Canada

CA 2335914 C 2009/11/10

(11)(21) **2 335 914**

(12) **BREVET CANADIEN
CANADIAN PATENT**

(13) **C**

(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 1999/06/29
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2000/01/06
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2009/11/10
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2000/12/28
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 1999/001565
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2000/000209
(30) Priorité/Priority: 1998/06/29 (FR98/08250)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *A61K 35/08* (2006.01)

(72) Inventeurs/Inventors:
YVIN, JEAN-CLAUDE, FR;
TABARY, OLIVIER, FR;
JACQUOT, JACKY, FR;
PUHELLE, EDITH, FR

(73) Propriétaire/Owner:
LABORATOIRE DE LA MER, FR

(74) Agent: SMART & BIGGAR

(54) Titre : UTILISATION DE SOLUTIONS SALINES ISOOSMOTIQUES, LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET
MEDICAMENT A BASE DE CES SOLUTIONS

(54) Title: USE OF ISO-OSMOTIC SALINE SOLUTIONS, METHOD FOR PREPARING SAME AND MEDICINE BASED
ON SAID SOLUTIONS

(57) **Abrégé/Abstract:**

L'invention a pour objet l'utilisation de solutions salines isoosmotiques, notamment obtenues à partir de l'eau de mer, pour l'obtention d'un médicament destiné à un traitement pour la prévention et la limitation de la libération des médiateurs chimiques responsables du déclenchement des phénomènes inflammatoires des muqueuses des voies respiratoires humaines.



**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 35/08	A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/00209 (43) Date de publication internationale: 6 janvier 2000 (06.01.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/01565 (22) Date de dépôt international: 29 juin 1999 (29.06.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/08250 29 juin 1998 (29.06.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): LABORA- TOIRES GOËMAR S.A. [FR/FR]; ZAC de la Madeleine, F-35400 Saint-Malo (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): YVIN, Jean-Claude [FR/FR]; 3, rue Gabriel Desgrés, F-35400 Saint-Malo (FR). TABARY, Olivier [FR/FR]; 2A, boulevard Henry Vasnier, F-51100 Reims (FR). JACQUOT, Jacky [FR/FR]; 31, rue de Magneux, F-51100 Reims (FR). PUCHELLE, Edith [FR/FR]; 21, rue Nicolas Henriot, F-51100 Reims (FR). (74) Mandataire: KOCH, Gustave; Cabinet Plasseraud, 84, rue d'Amsterdam, F-75440 Paris Cedex 09 (FR).		(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, 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, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, 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), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>
(54) Title: USE OF ISO-OSMOTIC SALINE SOLUTIONS, METHOD FOR PREPARING SAME AND MEDICINE BASED ON SAID SOLUTIONS (54) Titre: UTILISATION DE SOLUTIONS SALINES ISOOSMOTIQUES, LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET MEDICAMENT A BASE DE CES SOLUTIONS (57) Abstract The invention concerns the use of iso-osmotic saline solutions in particular obtained from sea water, to obtain a medicine designed for a treatment preventing and limiting the release of chemical mediators responsible for causing inflammatory phenomena in the human respiratory tracts. (57) Abrégé L'invention a pour objet l'utilisation de solutions salines isoosmotiques, notamment obtenues à partir de l'eau de mer, pour l'obtention d'un médicament destiné à un traitement pour la prévention et la limitation de la libération des médiateurs chimiques responsables du déclenchement des phénomènes inflammatoires des muqueuses des voies respiratoires humaines.		

**UTILISATION DE SOLUTIONS SALINES ISOOSMOTIQUES,
LEUR PROCÉDÉ DE PRÉPARATION ET MÉDICAMENT
À BASE DE CES SOLUTIONS**

5 L'invention a pour objet un médicament à base de solutions salines isoosmotiques.

Ce médicament est destiné à un traitement pour la prévention et la limitation de la libération des médiateurs chimiques responsables du déclenchement des phénomènes
10 inflammatoires des muqueuses des voies respiratoires humaines, notamment au niveau des fosses nasales et des bronches.

Dans le cas de certaines affections des fosses nasales, celles-ci sont le siège de réactions de défense
15 contre les agressions par les produits souvent irritants que transporte l'air ambiant, ces réactions de défense se traduisant par une accumulation de sécrétions muqueuses et mucopurulentes.

Ces sécrétions ont pour conséquence de conduire à
20 l'obstruction des fosses nasales.

Il est connu de lutter contre ce type d'obstruction en procédant au lavage des fosses nasales au moyen d'eau de mer isotonique.

Un produit qui donne d'excellents résultats à cet
25 égard est constitué par l'eau de mer isotonique commercialisée sous la marque PHYSIOMER.

Les muqueuses des voies respiratoires sont également le siège d'inflammations; celles-ci peuvent se traduire, soit par un œdème au niveau des muqueuses des fosses nasales qui
30 a son tour provoque un phénomène d'obstruction, rendant impossible la respiration par le nez, soit éventuellement par un œdème des muqueuses bronchiques entraînant des pathologies du type bronchopneumopathies.

Ces inflammations sont le résultat d'une agression de l'organisme, et plus particulièrement des voies respiratoires, par les virus et les bactéries transportés par l'air respiré et également par tous autres éléments irritants et allergisants que transporte cet air, notamment les pollens et tous autres produits qui sont à la base de la pollution atmosphérique.

Il est déjà connu de lutter contre ce type de pathologies en ayant recours à des agents décongestionnants à effet vasoconstricteur.

Il est également connu d'utiliser dans ce but des médicaments à base de corticostéroïdes.

Les résultats obtenus avec les agents décongestionnants et avec les corticostéroïdes sont satisfaisants mais ces agents ont des effets secondaires quelquefois gênants.

L'invention a donc pour but surtout de remédier aux inconvénients de l'art antérieur et de fournir pour le traitement des pathologies en question, un médicament exempt d'effets secondaires.

Et la Société Demanderesse --sachant que sous l'action de certains agents pro-inflammatoires d'origine bactérienne, tels que par exemple le lipopolysaccharide de P. Aeruginosa ou LPS, sérotype 10, utilisé à la concentration de 1 µg/ml, les cellules épithéliales, glandulaires, respiratoires humaines libèrent des médiateurs chimiques tels que l'interleukine 8, qui à leur tour déclenchent les phénomènes inflammatoires--, a le mérite d'avoir trouvé, à l'issue de travaux de recherche approfondis, que ce but était atteint en ayant recours à un médicament obtenu par l'utilisation d'une solution saline isoosmotique, notamment d'eau de mer isoosmotique et destiné à un traitement propre à prévenir et à limiter la libération, --sous l'influence des

agents pro-inflammatoires comprenant non seulement des substances d'origine bactérienne mais aussi les virus, les bactéries et tous autres éléments irritants et allergisants transportés par l'air respiré-- des médiateurs chimiques responsables du déclenchement des phénomènes inflammatoires des muqueuses des voies respiratoires humaines.

La solution saline isoosmotique dont il vient d'être question est caractérisée :

- par un pH de 7,8 à 8,3
- par une densité de 1,008 à 1,01
- par une teneur en matières sèches de 1 à 2% en poids
- par une osmolarité de 305 à 315 mOs/kg et
- par une constitution chimique résultant, pour ce qui est de ses principaux éléments, du tableau A ci-après :

TABLEAU A

Sodium (Na)	de 2000 à 2600 mg/l
Potassium (K)	de 40 à 80 mg/l
Chlorures (Cl)	de 5800 à 6000 mg/l
Calcium (Ca)	de 300 à 400 mg/l
Magnésium (Mg)	de 1200 à 1500 mg/l

En conséquence, l'invention réside dans l'utilisation de solutions salines isoosmotiques, notamment obtenues à partir de l'eau de mer, pour l'obtention d'un médicament destiné à un traitement limitant la libération des médiateurs chimiques responsables du déclenchement des phénomènes inflammatoires des muqueuses des voies respiratoires humaines.

Pour préparer les susdites solutions salines isoosmotiques, on peut procéder comme suit :

On utilise comme matière première une eau de mer prélevée par exemple à une profondeur de 5 à 10 mètres dans une zone à forts mouvements de courant, et caractérisée par une teneur en sels supérieure à 32 g/l.

11296-168

3a

L'invention a pour objet l'utilisation d'eau de mer rendue isoosmotique, pour l'obtention d'un médicament sous forme d'aérosols ou de nébulisats destiné à un traitement pour la prévention et la limitation de la libération, --sous l'influence des agents pro-inflammatoires comprenant des substances d'origine bactérienne, les virus, les bactéries et tous autres éléments irritants et allergisants transportés par l'air respiré--, d'un médiateur chimique responsable du déclenchement d'un phénomène inflammatoire des muqueuses bronchiques et pulmonaires, ladite eau de mer rendue isoosmotique ayant : - un pH de 7,8 à 8,3 ; - une densité de 1,008 à 1,01 ; - une teneur en matières sèches de 1 à 2% en poids ; - une osmolarité de 305 à 315 mOs/kg ; et - une constitution chimique résultant, pour ce qui est de ses principaux éléments, du tableau A ci-après :

TABLEAU A

Sodium (Na)	de 2000 à 2600 mg/l
Potassium (K)	de 40 à 80 mg/l
Chlorures (Cl)	de 5800 à 6000 mg/l
Calcium (Ca)	de 300 à 400 mg/l
Magnésium (Mg)	de 1200 à 1500 mg/l

Cette eau est analysée, décantée puis :

- désodée par une technique d'électrodialyse jusqu'à ce que son isotonicité soit d'environ 9 équivalents-grammes de chlorure de sodium au litre,
- 5 - filtrée,
- stockée dans des conditions stériles notamment en cuve en acier inoxydable.

Elle est ensuite analysée une nouvelle fois pour vérifier :

- 10 - sa stérilité et
- son isotonicité (physiologique).

Enfin, elle est conditionnée de façon stérile de préférence dans un local spécialement traité sous atmosphère contrôlée.

15 Les travaux qui sont à la base de l'invention comportent des expériences montrant que les solutions salines isoosmotiques utilisées conformément à l'invention sont moins toxiques que les deux produits de référence bien connus, constituées par le sérum physiologique et le tampon PBS, tout
20 en étant supérieurs à ces deux produits en ce qui concerne leur capacité à prévenir et à limiter la libération sous l'influence des agents pro-inflammatoires des médiateurs chimiques responsables du déclenchement des phénomènes inflammatoires des muqueuses des voies respiratoires.

25 Les toxicités respectives des solutions salines isoosmotiques utilisées conformément à l'invention, du sérum physiologique et du tampon PBS ont été définies par le biais d'une étude comparative portant sur la viabilité en présence de ces trois produits des cellules respiratoires humaines,
30 c'est-à-dire des cellules que l'on rencontre dans les muqueuses respiratoires.

Pour faire cette étude, on a utilisé des cellules glandulaires respiratoires humaines issues de prélèvements bronchiques humains.

On a ensemencé ces cellules épithéliales respiratoires à la même densité cellulaire dans des plaques de culture de 12 puits.

On les a cultivées pendant 48 heures dans un milieu de culture DMEM/F12 supplémenté d'une part avec 2% d'un nutriment constitué par le produit commercialisé sous la marque ULTROSER G et d'autre part avec une dose d'antibiotiques suffisante pour éviter la contamination bactérienne; on obtient ainsi des cultures en monocouche homogènes et confluentes, soit 310 000 cellules par puits de culture après 48 heures de culture.

Au moment où la confluence est atteinte, les cellules sont lavées avec une solution physiologique (PBS/Ca²⁺, pH 7.4) et mises en présence d'une part de la solution saline isoosmotique utilisée selon l'invention, d'autre part de sérum physiologique, d'autre part encore de tampon PBS et, enfin, d'un milieu de culture cellulaire de référence constitué par celui connu sous la désignation DMEM/F12.

A l'issue de plusieurs périodes d'incubation, c'est-à-dire de contact cellulaire, à savoir 4 heures, 8 heures, 16 heures et 24 heures, on a évalué la viabilité cellulaire en présence des quatre milieux dont il vient d'être question.

Cette viabilité cellulaire est exprimée par le pourcentage de cellules viables à la fin de chaque période d'incubation dans la solution saline isoosmotique utilisée selon l'invention, dans le sérum physiologique et dans le tampon PBS par rapport au nombre de cellules viables dans le milieu de culture DMEM/F12.

Elle a été évaluée à l'aide du test d'exclusion dit au bleu de Trypan, en solution à 0,4%, suivi d'un comptage avec une cellule de Malassez.

Conformément au test en question, on détache les cellules du support de culture en utilisant de la trypsine;

les cellules vivantes sont ensuite comptées dans une solution aqueuse à 0,4% de bleu de Trypan; en effet, le bleu de Trypan est un colorant cellulaire qui ne pénètre pas à l'intérieur d'une cellule vivante, seules les cellules non viables
5 laissant entrer le bleu de Trypan.

Le nombre de cellules vivantes dans le milieu de culture DMEM/F12 étant par définition rapporté à 100, il est possible d'exprimer la viabilité cellulaire dans les autres milieux, en pourcentage par rapport au milieu de culture.

10 Les résultats de cette étude montrent que les solutions salines isoosmotiques utilisées selon l'invention permettent une meilleure viabilité cellulaire sur des périodes d'incubation longues, c'est-à-dire jusqu'à 24 heures de contact. Le pourcentage de viabilité cellulaire
15 enregistré, à savoir 58%, est supérieur à celui enregistré avec le sérum physiologique, à savoir 48% et a fortiori supérieur à celui enregistré avec le tampon PBS ; ce dernier pourcentage est égal à zéro, la viabilité des cellules dans dans le tampon PBS étant donc nulle.

20 Dans le tableau B ci-après, on a réuni les pourcentages de viabilité cellulaire enregistrés dans le cadre des expériences qui précèdent pour les périodes d'incubation de 4, 8, 16 et 24 heures.

25

TABLEAU B

Milieux	Pourcentage de viabilité cellulaire			
	Périodes d'incubation			
	4 heures	8 h	16 h	24 h
Solution saline isoosmotique	100	85	79	59
Sérum physiologique	100	81	72	49
Tampon PBS	100	81	66	0
Milieu de culture DMEM/F12	100	100	100	100

La toxicité nettement moindre des solutions salines isoosmotiques par rapport au sérum physiologique et au tampon PBS ressort clairement des valeurs réunies dans le tableau B.

Pour la mise en évidence de la capacité des solutions salines isoosmotiques utilisées conformes à l'invention, à prévenir et à limiter la libération des médiateurs chimiques responsables du déclenchement des phénomènes inflammatoires des muqueuses des voies respiratoires humaines sous l'influence des agents pro-inflammatoires, on incube après stimulation par des agents pro-inflammatoires, les cultures cellulaires concernées dans les solutions salines isoosmotiques utilisées selon l'invention.

Les expériences réalisées par la Société Demanderesse, ont été effectuées sur des cultures sécrétoires glandulaires de la sous-muqueuse bronchique humaine.

Pour ce faire, on cultive les cellules en question dans un milieu de culture, par exemple le milieu de culture RPMI1640, additionné de 2% de milieu ULTROSER G, puis on élimine le milieu de culture, après avoir atteint une confluence de 90% et après avoir introduit l'agent pro-inflammatoire, constitué par le lipopolysaccharide de *P. Aeruginosa* ou LPS, sérotype 10, utilisé à la concentration de 1 µg/ml.

Après lavage des cellules ainsi traitées, on les réincube :

- dans le même milieu de culture RPMI 1640 seul qui joue le rôle de milieu de contrôle,
- dans le sérum physiologique (solution de NaCl à 0,9% en tant que milieu de référence),
- dans la solution saline isoosmotique utilisée selon l'invention.

La production de médiateur chimique responsable du déclenchement des phénomènes inflammatoires et constitué par

l'interleukine-8 par les cellules épithéliales glandulaires sous l'influence de l'agent pro-inflammatoire constitué par le LPS, est estimée par méthode de dosage ELISA (en utilisant le kit de dosage vendu sous la marque MEDGENIX DIAGNOSTIC, Belgique) après une période de temps de contact d'une heure dans les surnageants des trois milieux identifiés ci-dessus.

Les résultats enregistrés pour les trois milieux montrent que la production d'interleukine-8 est :

- de 121 pg/ml/heure dans le cas du milieu RPMI 1640,
- de 65 pg/ml/heure dans le cas du sérum physiologique,
- de 48 pg/ml/heure dans le cas de la solution saline isoosmotique utilisée selon l'invention,

ce qui montre la supériorité de cette dernière du point de vue de sa capacité à prévenir et à limiter la libération sous l'influence des agents pro-inflammatoires des médiateurs chimiques responsables du déclenchement des phénomènes inflammatoires des muqueuses des voies respiratoires.

Ces résultats ont été confirmés par des expériences réalisées sur la culture d'une lignée cellulaire de l'épithélium respiratoire de surface (ligne respiratoire 16-HBE).

Dans la pratique, la solution saline isoosmotique conforme à l'invention est administrée sous forme d'aérosols ou de nébulisats ou par instillation sous forme de gouttes.

Il s'agit d'un médicament destiné à un traitement limitant la libération des médiateurs chimiques responsables du déclenchement des phénomènes inflammatoires des muqueuses des voies respiratoires humaines survenant dans les affections rhinopharyngées et pulmonaires.

La solution saline isoosmotique utilisée conformément à l'invention peut être présentée sous la forme d'un Aérosol

nasal et buccal à action locale exerçant son effet sur les muqueuses des voies respiratoires humaines, notamment au niveau des fosses nasales et des bronches.

La posologie habituelle peut être de 2 bouffées
5 espacées d'une trentaine de secondes, répétées deux à trois fois par jour en inhalation buccale selon l'état et l'âge du patient.

Dans le cas d'une inhalation nasale, elle est
habituellement d'une à deux bouffées dans chaque narine
10 3 à 4 fois par jour selon l'état et l'âge du patient.

11296-168

10

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'eau de mer rendue isoosmotique, pour l'obtention d'un médicament sous forme d'aérosols ou de nébulisats destiné à un traitement pour la prévention et la limitation de la libération, --sous l'influence des agents pro-inflammatoires comprenant
- 5 des substances d'origine bactérienne, les virus, les bactéries et tous autres éléments irritants et allergisants transportés par l'air respiré--, d'un médiateur chimique responsable du déclenchement d'un phénomène inflammatoire des muqueuses bronchiques et pulmonaires, ladite eau de mer rendue isoosmotique ayant :
- un pH de 7,8 à 8,3 ;
 - 10 - une densité de 1,008 à 1,01 ;
 - une teneur en matières sèches de 1 à 2% en poids ;
 - une osmolarité de 305 à 315 mOs/kg ; et
 - une constitution chimique résultant, pour ce qui est de ses principaux éléments, du tableau A ci-après :

15

TABLEAU A

Sodium (Na)	de 2000 à 2600 mg/l
Potassium (K)	de 40 à 80 mg/l
Chlorures (Cl)	de 5800 à 6000 mg/l
Calcium (Ca)	de 300 à 400 mg/l
Magnésium (Mg)	de 1200 à 1500 mg/l