



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

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K	A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/58095 (43) Date de publication internationale: 18 novembre 1999 (18.11.99)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/IB99/00862</p> <p>(22) Date de dépôt international: 12 mai 1999 (12.05.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 98/06119 14 mai 1998 (14.05.98) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SEPHRA S.A.R.L. [FR/FR]; 83, rue Michel-Ange, F-75016 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): JOLY, Francine [FR/FR]; 41, avenue du Général Sarrail, F-75016 Paris (FR). BEAUVAIS, Francis [FR/FR]; 91, Grande Rue, F-92310 Sèvres (FR).</p> <p>(74) Mandataire: BURTIN, Jean-François; Cabinet GEFIB, 85, rue Anatole France, F-92300 Levallois Perret (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: BG, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, SG, TR, US, VN, YU, 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).</p> <p>Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i></p>	
<p>(54) Title: PHARMACEUTICAL, HYGIENIC AND/OR COSMETIC COMPOSITIONS CONTAINING SEA WATER AND USES</p> <p>(54) Titre: COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES, HYGIENIQUES ET/OU COSMETIQUES CONTENANT DE L'EAU DE MER ET LEURS UTILISATIONS</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns the field of therapeutic chemistry and more particularly pharmaceuticals, hygiene and/or cosmetology. The invention concerns a pharmaceutical, hygienic and/or cosmetic composition in particular for inhibiting degranulation of mastocytes, characterised in that it contains sea water and a basic amino acid or one of its salts or esters, or a plant and/or animal extract containing same, combined with an inert, non-toxic vehicle or excipient suited for the application intended. The invention also concerns the use of sea water on its own, or the basic amino acid on its own, to produce a pharmaceutical, hygienic and/or cosmetic composition in particular for inhibiting the activation of mastocytes, in particular degranulation.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention se rapporte au domaine de la chimie thérapeutique et plus particulièrement à celui de la pharmacie, de l'hygiène et/ou de la cosmétologie. La présente invention a pour objet une composition pharmaceutique, hygiénique et/ou cosmétique destinée notamment à inhiber la dégranulation des mastocytes caractérisée en ce qu'elle contient de l'eau de mer et un aminoacide basique ou l'un de ses sels ou esters, ou un extrait végétal et/ou animal en contenant, en association ou en mélange avec un véhicule ou un excipient inerte, non toxique, approprié pour l'application envisagée. Elle a encore pour objet l'utilisation de l'eau de mer seule, ou, de l'acidoaminoacide basique seul, en vue de la réalisation d'une composition pharmaceutique, hygiénique et/ou cosmétique destinée notamment à inhiber l'activation des mastocytes, en particulier la dégranulation.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

**COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES, HYGIENIQUES ET/OU COSMETIQUES
CONTENANT DE L'EAU DE MER ET LEURS UTILISATIONS**

La présente invention se rapporte au domaine de la chimie thérapeutique et plus
5 particulièrement à celui de la pharmacie, de l'hygiène et/ou de la cosmétologie.

La présente invention a pour objet une composition pharmaceutique, hygiénique et/ou
cosmétique contenant de l'eau de mer et un aminoacide basique ou un de ses sels ou un de ses
esters. Les principaux aminoacides basiques sont l'arginine, la lysine, la citrulline ou l'ornithine.
10

Les compositions pharmaceutiques, hygiéniques et/ou cosmétiques conformes à l'invention
présentent une action inhibitrice de l'activation des mastocytes induite par des neuropeptides.
En particulier, les compositions selon l'invention présentent une action inhibitrice sur la
dégranulation des mastocytes induite par la substance P. En conséquence, ces compositions
15 manifestent des effets anti-inflammatoires et/ou anti-allergiques et peuvent être utilisées pour
prévenir et/ou traiter des affections liées à une libération d'histamine.

La peau et les muqueuses sont le siège d'agressions multiples auxquelles elles répondent par
une réaction inflammatoire. Ainsi, les stimuli nociceptifs (température, stimuli mécaniques,
20 irritants chimiques, allergènes, UV...) provoquent la libération de neuromédiateurs, en
particulier de la substance P. Ces substances sont capables d'induire une réaction inflammatoire
qui est alors dite « neurogène ». Il est important de noter que l'inflammation neurogène est en
fait une composante de toute inflammation quelle qu'en soit la cause (Ratzlaff et al, 1992, J.
Neuroimmunol. 41:89-96). Par conséquent toute substance capable d'interférer avec les effets
25 de la substance P est susceptible d'avoir un effet anti-inflammatoire, anti-allergique,
insensibilisant et antalgique.

Les neurokinines constituent une famille de peptides qui sont libérés par les nerfs sensitifs.
Cette famille comprend la substance P, les neurokinines A et B. Les neurokinines ainsi que le
CGRP (calcitonin gene related peptide) et le VIP (vasoactive intestinal peptide) sont des
30 médiateurs du système nerveux périphérique NANC (non adrénérique, non cholinérique).
Tous ces peptides peuvent être libérés par les fibres nerveuses sensitives (fibres C) qui
innervent la peau. Ce sont principalement des médiateurs inflammatoires. Libérés dans la peau,
les neurokinines, et notamment la bradykinine, induisent démangeaisons, rougeurs, oedème...

Ces symptômes sont liés en grande partie à la libération d'histamine par la substance P à partir des mastocytes cutanés.

La substance P a un effet stimulant sur la prolifération des lymphocytes, la synthèse d'immunoglobulines, la dégranulation des mastocytes, la phagocytose des macrophages, le chimiotactisme et la libération de médiateurs par les neutrophiles. La substance P est donc un

5 facteur très important de l'inflammation neurogène. L'injection intradermique de substance P chez l'homme ou l'animal (souris, cobaye) provoque un érythème en quelques minutes. Au point d'injection, l'étude histologique révèle une augmentation importante du nombre de neutrophiles et d'éosinophiles intra- et périvasculaires. Le mécanisme de cette accumulation de

10 cellules inflammatoires dans la peau semble impliquer deux voies (Smith et al, 1993, J. Immunol. 151:3274-3282). D'une part, la substance P induit la dégranulation des mastocytes cutanés provoquant ainsi la libération de médiateurs de l'inflammation tels que l'histamine et des médiateurs chimiotactiques pour les polynucléaires (LTB₄, Paf-acéther). D'autre part, la substance P augmente l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales

15 microvasculaires du derme, et induit la libération de cytokines pro-inflammatoires par les mastocytes. Une grande partie des effets inflammatoires de la substance P au niveau de la peau sont donc liés à la dégranulation des mastocytes cutanés (mastocytes de type séreux). Des études histologiques et ultrastructurales ont montré que les fibres C étaient en contact étroit avec les mastocytes cutanés. Les libérations de substance P et d'histamine s'amplifient donc

20 mutuellement dans une boucle d'auto-entretien.

Selon la présente invention, le demandeur a découvert, de façon surprenante, que l'eau de mer prise isolément, ainsi que l'acide aminé basique pris isolément, présentent chacun une action

25 inhibitrice de l'activation des mastocytes induite par des neuropeptides, et, en particulier une action inhibitrice sur la dégranulation des mastocytes induite par la substance P. En conséquence, l'eau de mer, tout comme l'acide aminé basique, sont des inhibiteurs de la libération d'histamine induite par la substance P. De plus, le demandeur a découvert, d'une manière tout à fait inattendue que l'association de ces deux constituants manifeste un effet synergique net sur l'inhibition de l'activation des mastocytes induite par des neuropeptides, et,

30 en particulier sur l'inhibition de la dégranulation des mastocytes induite par la substance P.

Ainsi, les compositions conformes à l'invention, et notamment celles contenant l'association eau de mer-acide aminé basique constituent, grâce à leur action inhibitrice sur la libération

d'histamine, un progrès technique important pour le traitement des manifestations allergiques et/ou inflammatoires.

En effet, l'allergie et l'inflammation (notamment cutanée), posent encore aujourd'hui de nombreux problèmes aux thérapeutes qui ne disposent que d'un nombre limité de substances actives. En outre, certaines de ces substances, comme par exemple les corticoïdes, peuvent
5 présenter des effets secondaires souvent pénalisants (atrophies, vieillissement de la peau, infections mycotiques ou bactériennes etc.).

La présente invention a plus particulièrement pour objet une composition pharmaceutique, hygiénique et/ou cosmétique destinée notamment à inhiber la dégranulation des mastocytes caractérisée en ce qu'elle contient de l'eau de mer et un aminoacide basique ou l'un de ses sels ou esters, ou un extrait végétal et/ou animal en contenant, en association ou en mélange avec un véhicule ou un excipient inerte, non toxique, approprié pour l'application envisagée.
10

Elle a aussi pour objet l'utilisation de l'eau de mer en vue de la réalisation d'une composition pharmaceutique, hygiénique et/ou cosmétique destinée notamment à inhiber l'activation des mastocytes, en particulier la dégranulation.
15

Elle a encore pour objet l'utilisation d'un aminoacide basique, et notamment de l'arginine ou de l'un de ses sels ou esters, ou d'un extrait végétal et/ou animal en contenant, en vue de la réalisation d'une composition pharmaceutique, hygiénique et/ou cosmétique destinée notamment à inhiber l'activation des mastocytes, en particulier la dégranulation.
20

Les aminoacides basiques ont de nombreuses propriétés pharmacologiques. Le principal représentant est l'arginine, qui est un acide aminé naturel à reste guanidine. Il est, sous l'effet de la NO-synthase, à l'origine de la formation du monoxyde d'azote. La L-arginine est connue pour ses propriétés bioénergétiques et antiasthéniques, comme stimulant la biosynthèse de l'hormone de croissance, contre la sénescence du cristallin, ainsi que pour lutter contre l'hyperammoniémie et ses conséquences.
25

Selon l'invention, l'arginine utilisée peut être d'origine naturelle ou synthétique.
30

Un exemple d'extrait végétal et/ou animal contenant un aminoacide basique est un extrait d'algue, un extrait de boue marine, thermale ou lacustre, un extrait de bactérie. Ces extraits végétaux et/ou animaux proviennent notamment de péloïdes. Ainsi, des compositions contenant de l'eau de mer associée par exemple à des extraits de boues marines, sont, dans la

mesure où ces extraits contiennent un aminoacide basique, notamment de l'arginine, conformes à l'invention.

L'arginine, quand elle est obtenue par voie naturelle, est sous forme lévogyre (L-arginine). L'arginine utilisée de préférence dans la présente invention, est la L-arginine.

5 L'arginine peut également être obtenue par voie synthétique, sous forme racémique. On pourra, selon l'invention, utiliser la DL-arginine ou bien encore utiliser de la D-arginine.

L'arginine peut être utilisée soit sous forme libre, soit sous forme de l'un de ses sels ou de ses esters pharmaceutiquement et/ou cosmétiquement acceptables. Parmi les sels d'arginine, on pourra citer le mono- ou dichlorhydrate, le mono- ou dibromhydrate, le sulfate, le glutamate, le
10 pidolate ou le chlorhydrate. Parmi les esters on pourra citer l'ester méthylique ou l'ester éthylique de ceux-ci.

L'eau de mer utilisée dans la présente invention est prélevée notamment dans des mers ou océans, mais aussi dans des résurgences ou infiltrations où circule l'eau de mer. Elle peut être
15 filtrée et stérilisée par filtration stérilisante complémentaire.

Les mers et océans sont par exemple l'Atlantique ou la Manche. L'eau de mer est filtrée sur un filtre assez large afin d'éliminer les particules solides en suspension, et elle est stérilisée par passage sur une membrane stérilisante.

L'eau de mer ainsi filtrée et stérilisée peut ensuite, selon les usages envisagés, être amenée à
20 l'isotonie par dilution ou par désionisation.

L'eau de mer peut être désionisée par adsorption sélective du sodium et/ou remplacement du sodium par un autre ion métallique comme le calcium ou le magnésium. On peut ainsi renforcer la teneur de l'eau de mer en sels de calcium et/ou de magnésium tout en diminuant la teneur en sels de sodium ou de potassium. De la même façon on peut modifier la teneur en bromates
25 et/ou en bromures.

Dans les compositions conformes à l'invention, contenant l'association eau de mer-aminoacide basique, la quantité d'eau de mer représente de 30 % à 99 % du poids total de la composition. Plus particulièrement, la quantité d'eau de mer représente de 60 % à 95 % du poids total de la
30 composition. La quantité d'aminoacide basique, dans les compositions contenant l'association eau de mer-aminoacide, représente de 0,0001 % à 10 % du poids total de la composition. Plus particulièrement, la quantité d'aminoacide basique représente de 0,0005 % à 2 % du poids total de la composition.

Cependant, lorsque l'eau de mer est utilisée seule, ou, inversement lorsque l'acide aminé basique est utilisé seul, en vue de la réalisation d'une composition pharmaceutique, diététique et/ou cosmétique destinée notamment à inhiber la dégranulation des mastocytes, les pourcentages seront différents.

- 5 Les modalités données ci-dessous se réfèrent plus particulièrement à la composition telle que définie précédemment, contenant l'eau de mer et un acide aminé basique comme l'arginine. Cependant, ces modalités sont également applicables lorsque l'eau de mer est utilisée seule, ou, inversement lorsque l'acide aminé basique est utilisé seul, en vue de la réalisation d'une composition pharmaceutique, hygiénique et/ou cosmétique destinée notamment à inhiber la
- 10 dégranulation des mastocytes.

On peut, en outre, associer à la composition selon l'invention des agents actifs supplémentaires destinés notamment à la prévention et/ou au traitement d'affections inflammatoires et/ou allergiques. Ainsi, la composition est encore caractérisée en ce qu'elle contient au moins un

15 agent choisi parmi les agents antibactériens, antiparasitaires, antifongiques, antiprurigineux, anti-radicaux libres, anesthésiques, antiviraux, antipelliculaires, anti-acnéiques, des antiséborrhéiques, des vitamines et/ou des agents cicatrisants, et/ou prévenant ou traitant le vieillissement (de la peau, des gencives, ...), les agents tenseurs.

20 La composition conforme à l'invention peut en outre renfermer un agent de régulation du pH. Le pH de la composition conforme à l'invention est réglé dans une zone s'étendant de 5,5 à 9, de préférence de 6 à 8. L'agent régulateur du pH est par exemple un tampon comme un phosphate de métal alcalin ou un mélange de phosphates mono- et di-alcalins.

25 Les compositions conformes à l'invention sont particulièrement utilisées pour prévenir et/ou traiter les affections liées à une libération de médiateurs de l'inflammation et/ou de l'allergie tels que l'histamine ou les cytokines.

Des exemples de telles affections sont notamment les manifestations allergiques et/ou inflammatoires, quelle qu'en soit l'origine et le point d'application, notamment la peau, les

30 yeux, les bronches et le nez.

Ainsi, lesdites compositions sont destinées notamment à la prévention et/ou au traitement de l'urticaire, de l'eczéma, du psoriasis, des rougeurs ou irritations cutanées, des prurits, des dartres, des érythèmes (en particulier solaires), des piqûres d'insectes, des brûlures, des conjonctivites allergiques, de l'asthme bronchique allergique ou de l'effort, du rhume des foins,

des rhinites et trachéites spasmodiques. Elles peuvent aussi être utilisées en ORL chez les adultes mais aussi chez les nourrissons et les jeunes enfants (décongestion du nez ou lavage des muqueuses), lorsque ceux-ci présentent des surinfections pharyngées, ou sont enrhumés, ou encore, lorsque la muqueuse nasale est congestionnée. Lesdites compositions pourront encore
5 être utilisées pour traiter les pathologies veineuses comme par exemple les thrombophlébites, les troubles liés à l'insuffisance veineuse lymphatique (cellulite, jambes lourdes...).

Les compositions conformes à l'invention peuvent également être destinées aux lignes de produits hypoallergéniques et/ou pour peaux allergiques, pour les peaux sensibles (irritables, réactives, intolérantes), pour l'usage bucco-dentaire et pour la cicatrisation des plaies et des
10 traumatismes.

Les compositions selon l'invention trouvent aussi un emploi dans la prévention ou le traitement du vieillissement cutané.

Selon la voie d'administration et l'usage envisagé, la composition pharmaceutique, hygiénique
15 et/ou cosmétique se présentera sous une des quelconques formes galéniques normalement utilisées. La composition pourra se présenter sous forme solide ou liquide ou lyophilisée. La forme solide sera par exemple en comprimés, en capsules, en gélules, en pilules, en crème, en gel, en pommade, en émulsion solide. La forme liquide sera par exemple une solution, un soluté, une suspension, un collyre, un sérum, une lotion, un lait, une émulsion huile dans l'eau
20 ou eau dans l'huile. On pourra administrer les compositions selon l'invention sous forme de patches.

La voie d'administration envisagée pourra être la voie cutanée, orale, percutanée, parentérale, nasale, oculaire, buccale, gingivale, bronchique, vaginale, rectale... De même, les excipients utilisés sont ceux qui sont normalement appropriés selon la voie d'administration et l'usage
25 envisagé.

La composition selon l'invention est de préférence destinée à être appliquée sur la peau (sur toute zone cutanée du corps) et les muqueuses, en particulier nasales ou oculaires.

Ainsi, pour une application à visée thérapeutique concernant les yeux, les compositions de
30 l'invention peuvent se présenter sous forme de collyre, de pommade ou de solution de lavage oculaire.

Parmi les aminoacides basiques de l'invention, on pourra citer plus particulièrement :

- ceux à fonction guanidine, comme l'arginine, l'homoarginine ;

- ceux à fonction amine, comme la lysine, l'acide diaminopimelique ou l'acide diaminovalérique ;
- ceux à fonction ammonium quaternaire, comme la carnitine, l'homarine ;
- ceux substitués par un méthyle, comme l' α -méthyl m.tyrosine ou l'acide N-méthylaspartique ;
- 5 - ceux substitués par un groupement carboxamide, comme l'ornithine ;
- ceux substitués par un groupe cyano :
- ceux substitués par un groupe méthylamino, comme la sarcosine ;
- ceux substitués par un groupe phosphonique.

10 **PARTIE EXPERIMENTALE**

Etude de l'action de l'eau de mer seule, de l'arginine seule, et, de la composition contenant à la fois l'eau de mer et l'arginine sur la libération d'histamine.

I) Modèle in vitro

- 15 On étudie ici les effets inhibiteurs de l'eau de mer seule, de l'arginine seule, et, de l'eau de mer supplémentée en arginine, sur l'inflammation neurogène. Ainsi, on étudie in vitro, si l'eau de mer supplémentée en arginine inhibe la dégranulation des mastocytes péritonéaux de rat induite par la substance P, et, si ladite eau de mer supplémentée en L-arginine présente un effet synergique net par rapport à chacun des deux constituants pris isolément.
- 20 Les mastocytes péritonéaux de rat sont considérés en pharmacologie comme un modèle des mastocytes cutanés humains.

a) Introduction

- 25 Il existe deux sous-populations mastocytaires distinctes : les mastocytes « muqueux » (appelés autrefois atypiques) présents classiquement dans les muqueuses, et, les mastocytes séreux (ou « mastocytes du tissu conjonctif ») présents dans la peau et la cavité péritonéale. Ces deux sous-classes sont distinctes par leur localisation tissulaire, leurs propriétés histologiques, immunologiques et fonctionnelles. Les mastocytes de la cavité péritonéale de rat sont un
- 30 modèle pharmacologique classique des mastocytes cutanés humains.

L'activation des mastocytes peut non seulement faire intervenir la stimulation de leurs récepteurs spécifiques des IgE mais également leur réactivité à différents peptides. Ainsi, la voie d'activation peptidergique des mastocytes constitue la seconde voie d'activation physiologique de ces cellules, à côté de la voie dépendante des IgE (voie antigénique).

b) Protocole expérimental

Les mastocytes péritonéaux de rat sont obtenus par lavage après injection d'une solution de Tyrode. Les mastocytes représentent 8 à 10 % des cellules péritonéales composées également de macrophages, lymphocytes et monocytes. Les mastocytes sont purifiés sur un coussin de métrizamide à 22,5 % puis remis en suspension dans une solution de Tyrode.

Composition de la solution de Tyrode (en mM) :

- NaCl : 137
- KCl : 2,6
- 10 - glucose : 5,6
- HEPES : 4,2
- CaCl₂ : 0,3
- Sérum albumine bovine : 0,25 %

15 Les mastocytes sont préincubés (5 min; 37° C au bain-marie) avec un témoin (le tampon Tyrode), avec différentes concentrations d'eau de mer seule, d'arginine seule, ou d'eau de mer supplémentée en arginine, dans le tampon Tyrode.

Les mastocytes sont ensuite stimulés par la substance P (5 min; 37° C). De l'acide perchlorique (0,4N final) est ajouté sur les culots et les surnageants cellulaires puis l'histamine est mesurée par une méthode spectrofluorimétrique.

c) Résultats

Les résultats sont donnés dans le tableau 1 ci-dessous :

25 Tableau 1 :

Pourcentage d'histamine libérée	Arginine 0mM	Arginine 1mM	Arginine 3mM
0% eau de mer	55 ± 8	38 ± 6	19 ± 4
3% eau de mer	35 ± 7	22 ± 5	6 ± 3
10% eau de mer	6 ± 1	2 ± 1	1 ± 1
20% eau de mer	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0

La colonne 1 du tableau 1 représente les résultats obtenus avec respectivement le témoin, i.e 0% eau de mer, 100% solution Tyrode, une concentration d'eau de mer à 3 % + 97% solution Tyrode, une concentration d'eau de mer à 10 % + 90% solution Tyrode, et, une concentration d'eau de mer à 20 % + 80% solution Tyrode. La colonne 2 représente les résultats obtenus avec respectivement les mêmes concentrations (eau de mer/solution Tyrode) que dans la colonne 1 avec en plus de l'arginine à une concentration de 1mM. De même, la colonne 3 représente les résultats obtenus avec respectivement les mêmes concentrations (eau de mer/solution Tyrode) que dans la colonne 1, avec en plus de l'arginine à une concentration de 3mM.





10

Les résultats du tableau 1 sont exprimés en pourcentages de libération d'histamine \pm S.E.M.

n = 6 expériences

Le tableau 1 est représenté par la figure 1.

15

Les symboles \square ,  ,  , \blacksquare , de la figure 1 représentent :	
\square	0 % eau de mer (100% Solution Tyrode) (supplémenté éventuellement en L-arginine)
	3 % eau de mer (97 % Solution Tyrode) ("
	10 % eau de mer (90% Solution Tyrode) ("
\blacksquare	20 % eau de mer (80% Solution Tyrode) ("

20

Le pourcentage de libération d'histamine induite par la stimulation peptidergique est de 55 ± 8 %. En présence d'eau de mer seule, la libération d'histamine diminue plus ou moins fortement en fonction de la concentration d'eau de mer dans la préparation. Ainsi, pour une concentration d'eau de mer de 3% dans la préparation, la libération d'histamine est de 35 ± 7 % ; pour une concentration d'eau de mer de 10%, la libération d'histamine est de 6 ± 1 % et, en présence d'une concentration d'eau de mer de 20%, la libération d'histamine n'est plus que de 1 ± 0 %.

25

Ainsi, même en présence d'un pourcentage faible d'eau de mer (3%), on peut déjà noter une inhibition de la dégranulation mastocytaire. L'inhibition de la libération d'histamine est d'autant plus importante que la concentration en eau de mer est élevée.

30

De même, en présence d'arginine seule, la libération d'histamine diminue également. Ainsi, en présence d'arginine seule à une concentration de 1 mM, la libération d'histamine est de

38 ± 6 %, et, en présence d'arginine seule à 3 mM, la libération d'histamine n'est plus que de 19 ± 4 %.

Ainsi, le traitement des mastocytes par l'eau de mer seule, ou, par l'arginine seule, induit une inhibition dose-dépendante de la dégranulation des mastocytes induite par la substance P.

Le traitement des mastocytes par la composition selon l'invention, contenant de l'eau de mer et un aminoacide basique comme l'arginine, potentialise l'inhibition de la libération d'histamine par rapport à celle observée lorsque les cellules sont incubées uniquement en présence d'eau de mer ou d'arginine.

d) Conclusion

Les effets inhibiteurs de l'eau de mer et d'un aminoacide basique comme l'arginine se potentialisent mutuellement. On constate expérimentalement une efficacité accrue de ladite association sur l'inhibition de la dégranulation des mastocytes par rapport à celle de l'eau de mer seule ou de l'arginine seule.

Le tableau II ci-après reprend les résultats précédents fournis au tableau I sur l'inhibition de la libération d'histamine par l'eau de mer après induction par la substance P.

20

Ces résultats sont complétés :

- par l'étude de l'inhibition de la dégranulation des basophiles humains provoquée par un sérum anti IgE ;
- par l'étude de la dégranulation des mastocytes intrapéritonéaux de rats après induction par le VIP ; l'effet inhibiteur est totalement sous la dépendance de la concentration en eau de mer ;
- par l'étude de la dégranulation des mastocytes péritonéaux de rats induite par le CGRP ; on obtient à une concentration de 10 % en eau de mer une inhibition déjà très importante ;
- par l'étude de la dégranulation des mastocytes péritonéaux de rats induite par la bradykinine. L'inhibition de la dégranulation est pratiquement totale pour une concentration d'eau de mer à 10 %.

30

Tableau 2

Résumé de l'inhibition de la libération d'histamine par l'eau de mer		
Mastocytes péritonéaux du rat (SP 10µM)		
n=7	Moyenne	SEM
SP	55,5 %	6,7 %
SP + EM 3 %	34,7 %	6,2 %
SP + EM 10 %	6,8 %	1,5 %
SP + EM 20 %	1,4 %	1,3 %
Basophiles humains (anti-IgE 1/1000)		
n=3	Moyenne	SEM
a-IgE	52 %	9 %
a-IgE + eau de mer 3 %	26 %	2 %
a-IgE + eau de mer 10 %	17 %	2 %
a-IgE + eau de mer 20 %	10 %	1 %
Mastocytes péritonéaux de rats (VIP 3µM)		
n=4	Moyenne	SEM
VIP	61 %	3 %
VIP + eau de mer 3 %	44 %	5 %
VIP + eau de mer 10 %	14 %	3 %
VIP + eau de mer 20 %	4 %	2 %
Mastocytes péritonéaux de rats (CGRP 30µM)		
n=1	exp 1	
CGRP	79 %	
CGRP + 10 % eau de mer	44 %	
Mastocytes péritonéaux de rats (Bradykinine 30µM)		
n=1	exp 1	
Bradykinine	67 %	
Bradykinine + 10 % eau de mer	7 %	

SP : substance P

EM : eau de mer

5 VIP : Vasoactive Intestinal Peptide

II) Modèle in vivo

10 1. Effet de la composition contenant l'association eau de mer-arginine sur un modèle in vivo d'extravasement cutané.

a) Introduction

L'injection sous cutanée de substance P chez le rat ou le cobaye produit une inflammation de la peau du dos se traduisant par une vasodilatation cutanée et un extravasement des protéines plasmatiques. Ce modèle d'inflammation neurogène permet de tester des substances à visée anti-allergiques et/ou anti-inflammatoires. L'extravasement plasmatique liée à l'inflammation neurogénique est mis en évidence par le bleu d'Evans.

b) Protocole expérimental

10

Le dos de cobayes (mâles Hartley, 300 g) est rasé et une solution isotonique de bleu Evans est injectée dans la veine du pénis. Cent μl de substance P (0,62 μmol) sont dilués dans du sérum physiologique en présence ou non d'une solution d'eau de mer à 10 % et d'arginine (1 μmol) et ont été injectés en différents sites sous cutanés. L'extravasement plasmatique est visualisé par le bleuissement des téguments.

15

c) Résultats

Les résultats sont illustrés par le tableau 3. Les croix symbolisent l'intensité du bleuissement des téguments.

20

Tableau 3 :

Stimulus	Intensité de la réaction colorée
Substance P (SP)	+++
SP + eau de mer 10%	++
SP + eau de mer 10% + arginine	+

d) Conclusion

25

L'eau de mer seule à 10 % diminue l'extravasement induit par la substance P. Cet effet est potentialisé par l'arginine.

2. Essai « in vivo »

Evaluation de l'effet anti-inflammatoire sur l'inflammation neurogénique induite par la stimulation électrique de la veine saphène chez le rat.

5 a) Principe

Tout effet anti-inflammatoire neurogénique éventuel de l'eau de mer enrichie en arginine sur l'inflammation neurogénique induite par stimulation électrique de la veine saphène a été évalué chez le rat anesthésié. Le test consiste à induire une inflammation neurogénique par stimulation
10 de la veine saphène, ce nerf innervant la zone cutanée de la patte arrière. Sa stimulation induit la libération, à partir des terminaisons nerveuses, de neuromédiateurs responsables de l'inflammation neurogénique tels que la substance P ou le CGRP. L'inflammation neurogénique est appréciée par la mesure de l'extravasement du Bleu Evans qui survient au cours des processus inflammatoires.

15

b) Méthode expérimentale

Des rats Wistar mâles d'un poids moyen de 250 g ont été logés dans des cages de dimensions standard sous air conditionné.

20 Les animaux ont été répartis en quatre lots :

- le groupe 1 est un lot témoin recevant de l'eau bidistillée ;
- le groupe 2 est un lot témoin pour la méthode qui reçoit une substance témoin (Spantide II) qui est un antagoniste de la substance P à la dose de 30 nmol/animal ;
- et le groupe 3 est un lot qui reçoit l'eau de mer enrichie avec un aminoacide basique.

25

La veille de l'essai (jour 4) les animaux ont été traités avec de la guanethidine (20 mg/Kg s.c. à la dose de 1 mg/Kg pour éviter toute interaction avec les catécholamines.

Le jour de l'essai (jour 5), les animaux ont reçu selon le plan de randomisation le produit prévu
30 puis ils ont été anesthésiés avec du pentobarbital (60 mg/Kg IP à la dose de 1 mg/Kg). Environ 15 minutes après la fin du traitement, une solution à 2,5 % de bleu Evans dans le sérum physiologique a été injectée par la voie intraveineuse (1 mg/Kg). Immédiatement après, la veine saphène de la patte arrière droite a été stimulée (15v, 2Hz, 1mS) pendant 15 minutes.

L'inflammation neurogénique induite par la stimulation électrique de la veine saphène a été appréciée par la quantité de Bleu Evans extravasé. L'œdème a été également évalué par la différence de poids des échantillons cutanés de la patte arrière gauche (non stimulée) et droite (stimulée).

- 5 Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 4 ci-après. Le pourcentage de variation est calculé en relation avec le groupe témoin qui ne reçoit que de l'eau bidistillée.

Tableau 4

TRAITEMENT	Bleu Evans extravasé ($\mu\text{g}/\text{site}$)		OEDEME (mg)
Eau bidistillée	Med.	8.13	46.50
	Mini.	4.61	-3.00
	Maxi.	16.68	69.40
	N	8	8
SPANTIDE II 30 nmoles	Med.	1.57	5.20
	Mini.	-0.19	-38.10
	Maxi.	2.97	27.80
	N	8	8
	P	**	*
	%	-81	-89
Eau de mer + arginine	Med.	4.77	25.45
	Mini.	0.80	-5.80
	Maxi.	7.97	49.60
	N	8	8
	P	*	NS
	%	-41	-45

NS : $P > 0,05$

10

c) Conclusion

En conclusion, l'eau de mer enrichie en arginine provoque une inhibition de l'inflammation neurogénique induite par la stimulation électrique de la veine saphène. Cet effet est statistiquement significatif et représente une diminution de 41 % de l'extravasement cutané du Bleu Evans.

15

La composition selon l'invention amène également un effet important sur l'œdème.

Il est possible d'ajouter aux compositions selon l'invention un ou plusieurs principes actifs supplémentaires qui renforcent l'efficacité des compositions précédemment décrites. On pourra ainsi adjoindre un agent antibactérien comme la povidone iodée ou un sel de chlorhexidine ou d'hexamidine, un agent antiparasitaire comme le niclosamide, la pelletierine, la quinacrine, le chlorure de pyrvinium ou le chlorure d'embonium, un agent antifongique comme le cyclopirox sel d'olamine, le cotrimazole ou le fenticonazole, un antiprurigineux comme le camphre, le menthol, le phénol ou le salicylate de sodium ou le carbonate de bismuth, des agents antiradicaux libres comme l'acide ascorbique, l'ascorbate de sodium, le tocophérol ou la N-acétylcystéine, des anesthésiques comme la butacaïne, la stovaïne, la novocaïne ou la marcaïne, des agents anti-viraux comme la iododésoxyuridine, la lamivudine, l'acyclovir ou la didésoxyadenosine, des agents antipelliculaires comme la pyrithione zincique ou l'omadine zincique, des produits antiacnéiques comme l'acide caroténoïque, l'acide rétinolique, le rétinaldéhyde ou le peroxyde de benzoyle, des agents antiséborrhéiques comme le résorcinol, des produits cicatrisants comme le dextranomère ou l'acide hyaluronique, des vitamines du groupe de la Vitamine B (Vitamine B₁, Vitamine B₂, Vitamine B₆, Vitamine PP, Vitamine B₁₂), du groupe de la Vitamine A, du groupe de la Vitamine E et les substances du groupe de la Vitamine D dépourvues d'effet antirachitique.

On entend par agent cicatrisant du groupe des hydrocolloïdes toute substance minérale ou organique susceptible de former un gel au contact de la peau ou des muqueuses et apte à incorporer la préparation selon l'invention.

Les compositions selon l'invention sont destinées à la voie orale notamment sous forme de comprimés ou de gélules après adsorption sur un support inerte, à la voie gingivale sous forme de dentifrice ou d'eau dentifrice, à la voie vaginale, à la voie ophtalmique sous forme de collyres, à la voie auriculaire sous forme de gouttes auriculaires.

L'eau de mer peut assurément être utilisée seule. L'addition d'un aminoacide basique, et notamment de l'arginine, renforce sensiblement les effets de l'eau de mer.

L'eau de mer en effet agit sur les mastocytes et sur les basophiles pour inhiber leur dégranulation. Elle inhibe les effets du VIP, du CGRP, de la Bradykinine.

En outre, l'eau de mer seule inhibe la production de PGE₂ (prostaglandine E₂) sécrétée par des kératinocytes humains.

Les exemples de formulation suivants illustrent l'invention, ils ne la limitent en aucune façon.

EXEMPLE I**Collyre**

	- Eau de mer purifiée, stérilisée, désodée et isotonique	90 %
5	- Arginine	2 %
	- Sulfate de dextranne	1 %
	- Eau distillée, conservateur	qsp

10 **EXEMPLE II****Emulsion adoucissante pour peaux sensibles**

	- Eau de mer purifiée, stérilisée, désodée et isotonique	91 %
	- Arginine	2 %
15	- Emulsion cosmétique pour peaux sensibles	q.s.p.
	(alcools gras, alcools gras polyoxyéthylénés, huile minérale, palmitate d'isopropyle, glycérine, gélifiant, conservateurs, parfums, eau)	

20 **EXEMPLE III****Composition pour la voie orale**

	- Eau de mer purifiée, stérilisée	450 g
	- Chlorhydrate de lysine	14 g
25	- Hydroxyéthylcellulose	7 g
	- Carbonate de calcium	36 g
	- Silicate de magnésium	5 g
	- Bentonite	40 g

30 On adsorbe l'eau de mer purifiée sur le mélange bentonite + hydroxyéthylcellulose pour obtenir une masse pulvérulente que l'on granule puis broye. On ajoute alors le chlorhydrate de lysine puis le carbonate de calcium et finalement le silicate de magnésium.

La masse totale est finalement comprimée en 1000 comprimés d'un poids moyen de 0,520 g.

EXEMPLE IV**Composition pour la voie orale**

	- Eau de mer purifiée, stérilisée	173 g
5	- Pidolate d'arginine commercialisée sous la marque Argidone ® (Société PCIB)	60 g
	- Polyvinylpyrrolidone (Kollidon K90)	17 g
	- Polyéthylène glycol 4000	120 g
	- Carbonate de calcium	120 g
10	- Talc	10 g

L'eau de mer et le pidolate d'arginine sont adsorbés sur le polyéthylèneglycol 4000. Le mélange pâteux en résultant est dilué avec la polyvinylpyrrolidone, puis avec le carbonate de calcium. La poudre ainsi obtenue est additionnée du Talc et comprimée en comprimés d'un poids moyen de 0,500 g.

REVENDEICATIONS

1. Composition pharmaceutique, hygiénique et/ou cosmétique caractérisée en ce qu'elle contient de l'eau de mer et un aminoacide basique ou l'un de ses sels ou esters, ou un
5 extrait végétal et/ou animal, ou du phytoplancton en contenant, en association ou en mélange avec un véhicule ou un excipient inerte, non toxique, approprié pour l'application envisagée.
2. Composition pharmaceutique, hygiénique et/ou cosmétique selon la revendication 1,
10 caractérisée en ce que l'acide aminé basique porte un substituant guanidine, amine, amine substitué, un ammonium quaternaire, un méthyle, un groupe carboxamide, un groupe cyano, un groupe phosphonique ou hydrazide.
3. Composition pharmaceutique, hygiénique et/ou cosmétique selon la revendication 1 ou la
15 revendication 2, caractérisée en ce que l'extrait végétal et/ou animal contenant l'acide aminé basique est un extrait d'algue, un extrait de boue marine, thermale et/ou lacustre, un extrait de bactérie, un extrait de plancton.
4. Composition pharmaceutique, hygiénique et/ou cosmétique selon l'une quelconque des
20 revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'acide aminé basique est sous forme de l'un de ses sels ou esters tels que le mono- ou le dichlorhydrate, le mono- ou le dibromhydrate, le sulfate, le glutamate, le pidolate, l'ester méthylique ou l'ester éthylique.
5. Composition pharmaceutique, hygiénique et/ou cosmétique selon la revendications 1,
25 caractérisée en ce que l'acide aminé basique est l'arginine.
6. Composition pharmaceutique, hygiénique et/ou cosmétique selon la revendication 5, dans laquelle l'arginine est sous forme de pidolate.
7. Composition pharmaceutique, hygiénique et/ou cosmétique selon l'une quelconque des
30 revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'eau de mer est prélevée dans les mers, dans les océans ou dans les infiltrations ou les résurgences, qu'elle est filtrée et qu'elle est stérilisée par filtration stérilisante complémentaire.

8. Composition pharmaceutique, hygiénique et/ou cosmétique selon la revendication 7, caractérisée en ce que l'eau de mer, filtrée et stérilisée, est amenée à l'isotonie par dilution ou par désionisation.
- 5 9. Composition pharmaceutique, hygiénique et/ou cosmétique selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que la quantité d'eau de mer représente de 30% à 99% du poids total de la composition.
10. Composition pharmaceutique, hygiénique et/ou cosmétique selon la revendication 9,
10 caractérisée en ce que la quantité d'eau de mer représente de 60% à 95% du poids total de la composition.
11. Composition pharmaceutique, hygiénique et/ou cosmétique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que la quantité d'acide aminé basique représente de
15 0,0001% à 10% du poids total de la composition.
12. Composition pharmaceutique, hygiénique et/ou cosmétique selon la revendication 11,
caractérisée en ce que la quantité d'acide aminé basique représente de 0,0005% à 2% du
poids total de la composition.
20
13. Composition pharmaceutique, hygiénique et/ou cosmétique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'elle contient en outre un agent choisi parmi les agents antibactériens, les antiparasitaires, les antifongiques, les antiprurigineux, les anti-radicaux libres, les anesthésiques, les agents antiviraux, les agents antipelliculaires, les
25 produits anti-acnéiques, les agents antiséborrhéiques, les produits cicatrisants sous forme d'hydrocolloïdes et les agents vitaminiques.
14. Composition pharmaceutique, hygiénique et/ou cosmétique selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisée en ce qu'elle renferme en outre un agent de régulation du
30 pH.
15. Composition pharmaceutique, hygiénique et/ou cosmétique selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que le pH est réglé dans une zone s'étendant de 5,5 à 9.

16. Composition pharmaceutique, hygiénique et/ou cosmétique selon l'une des revendications 1 à 12 à laquelle on associe un aminoglycane, un polysaccharide ou un polymère polysaccharidique.

5

17. Compositions pharmaceutiques, hygiéniques et/ou cosmétiques selon l'une des revendications 1 à 16 caractérisée en ce qu'elles se présentent sous l'une des formes appropriées pour l'administration par voie orale, par voie topique, par voie gingivale, par voie vaginale, par voie auriculaire et/ou par voie ophtalmique.

10

18. Utilisation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, pour la réalisation d'un médicament apte à prévenir et/ou traiter les affections liées à une libération de médiateurs de l'inflammation et/ou de l'allergie tels que l'histamine ou les cytokines.

15 19. Utilisation d'une composition selon la revendication 18, pour réaliser un médicament apte à prévenir et/ou traiter les manifestations allergiques et/ou inflammatoires, notamment au niveau de la peau, des yeux, des bronches et du nez.

20 20. Utilisation de l'eau de mer en vue de la réalisation d'une composition pharmaceutique, hygiénique et/ou cosmétique destinée notamment à inhiber l'activation des mastocytes notamment induite par la substance P ou par le VIP ou par le CGRP ou par la bradykinine, et/ou à inhiber la dégranulation des basophiles.

25 21. Utilisation d'un aminoacide basique ou de l'un de ses sels ou esters, et notamment de l'arginine ou d'un extrait végétal et/ou animal en contenant, en vue de la réalisation d'une composition pharmaceutique, hygiénique et/ou cosmétique destinée notamment à inhiber l'activation des mastocytes.

1/1

Figure 1

