



N° 891.160

Classif. Internat.: **A61K**Mis en lecture le: **16-03-1982**

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la loi du 24 mai 1854 sur les brevets d'invention;

Vu la Convention d'Union pour la Protection de la Propriété Industrielle;

Vu le procès-verbal dressé le 17 novembre 1981 à 15 h.40

au Service de la Propriété Industrielle ;

ARRÊTE :

Article 1. — Il est délivré à la Sté dite : ISTITUTO FARMACOLOGICO
SERONO S.P.A.

Via Casilina, 125, Rome (Italie)

repr. par l'Office Kirkpatrick-G.C. Plucker à Bruxelles,

un brevet d'invention pour: Composition pharmaceutique contenant de
l'orgotéine

qu'elle déclare avoir fait l'objet d'une demande de brevet
déposée en Italie le 27 mai 1981, n° 48551A/81

Article 2. — Ce brevet lui est délivré sans examen préalable, à ses risques et
périls, sans garantie soit de la réalité, de la nouveauté ou du mérite de l'invention, soit
de l'exactitude de la description, et sans préjudice du droit des tiers.

Au présent arrêté demeurera joint un des doubles de la spécification de l'invention
(mémoire descriptif et éventuellement dessins) signés par l'intéressé et déposés à l'appui
de sa demande de brevet.

Bruxelles, le 15 décembre 1981.

PAR DÉLÉGATION SPÉCIALE:

Le Directeur

001160

MÉMOIRE DESCRIPTIF

DÉPOSÉ A L'APPUI D'UNE DEMANDE
DE

BREVET D'INVENTION

FORMÉE PAR

ISTITUTO FARMACOLOGICO SERONO S.p.A.

p o u r

Composition pharmaceutique contenant de l'orgotéine.

Demande de brevet italien n° 48551A/81 du 27 mai 1981 en
sa faveur.

La présente invention concerne une composition à usage thérapeutique qui contient de l'orgotéine dans laquelle l'activité anti-inflammatoire de l'orgotéine est notablement accrue et prolongée dans le temps.

L'orgotéine est une métalloprotéine contenant du cuivre et du zinc qui peut être extraite des globules rouges et de différents tissus de nombreuses espèces de mammifères. Elle appartient à la classe des enzymes qui ont une activité de dismutation des peroxydes conduisant physiologiquement à

CD.MJ.PG.4F

P/O12/54

l'élimination des radicaux peroxyde O_2^- qui se forment pendant la respiration cellulaire et qui sont nuisibles pour l'organisme.

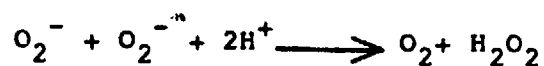
La présence des radicaux peroxyde dans les fluides extracellulaires peut être considérée comme anormale du fait que s'ils ne sont pas rapidement éliminés, ils peuvent déterminer dans les tissus exposés des altérations graves accompagnées de manifestations pathologiques de divers ordres.

Des études récentes ont démontré qu'une production anormale de radicaux peroxyde s'observe dans différents types d'inflammation.

Des recherches effectuées sur des patients atteints d'arthropathie de type soit inflammatoire chronique, soit dégénératif (arthrite rhumatoïde, ostéoarthrose) ont mis en lumière que l'orgotéine administrée par voie intramusculaire, intra-articulaire ou perarticulaire exerce une action anti-inflammatoire puissante parce qu'elle est capable d'éliminer les radicaux peroxyde présents au niveau des articulations atteintes par le processus pathologique et d'interrompre ainsi l'un des processus pathogènes qui entretiennent cette affection.

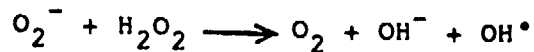
Les études de biochimie ont indiqué le mécanisme d'action par lequel les enzymes ayant une activité de dismutation des peroxydes, et en particulier l'orgotéine, suppriment les radicaux peroxyde nuisibles des fluides extracellulaires.

La réaction principale est une réaction de dismutation, dans laquelle les enzymes précitées exercent la fonction de catalyseurs, qui mène à la transformation des radicaux peroxyde en oxygène moléculaire et peroxyde d'hydrogène:



891150

Toutefois, en présence d'un excès de radicaux peroxyde, il peut y avoir une seconde réaction qui conduit à la formation de radicaux $\text{OH}^\bullet$, aussi dangereux que les radicaux peroxyde parce qu'ils sont capables de provoquer une dégradation des fluides extracellulaires tels que, par exemple, le liquide synovial:



Il résulte de manière évidente des indications ci-dessus que bien qu'utile aux fins d'interrompre le mécanisme inflammatoire pathogène, l'orgotéine (ou autre de dismutase des peroxydes) peut être insuffisante par elle-même pour garantir une rémission complète des symptômes au niveau des articulations atteintes par le processus pathologique.

Le processus peut en fait procéder par la seconde voie indiquée sans que la dismutase des peroxydes précitée soit capable d'interrompre de manière définitive la production des radicaux libres.

Un but de l'invention est de procurer une nouvelle composition à usage thérapeutique contenant de l'orgotéine dans laquelle l'activité anti-inflammatoire de l'orgotéine est notablement accrue et prolongée dans le temps.

D'autres buts de l'invention ressortent de manière évidente de la description et des exemples ci-après.

On atteint les buts précités au moyen d'une composition à usage thérapeutique contenant de l'orgotéine et du mannitol.

Le mannitol est connu comme étant un excipient courant pour les préparations pharmaceutiques surtout les préparations à injecter.

Dans le cas spécifique de l'orgotéine, l'utilisation du mannitol comme excipient devrait être considérée comme

inopportune en raison des résultats donnés dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 3.637.640 qui a pour objet des compositions stabilisées d'orgotéine avec du saccharose et d'autres sucres. Suivant le brevet précité, les sucres définis tels quels sont de nature à protéger l'orgotéine contre la dénaturation pendant le processus de lyophilisation et la durée de validité ultérieure du produit lyophilisé.

Les données rassemblées ci-après (voir tableau de l'exemple 2) démontrent que la lyophilisation en présence de mannitol ne provoque aucune dénaturation de l'orgotéine qui reste stable sous forme lyophilisée pendant plus de deux ans.

Bien que la validité de la présente invention ne soit liée à celle d'aucune hypothèse particulière, on pourrait présumer que la qualité de l'orgotéine décrite dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 3.637.640 précité devait être différente, surtout en ce qui concerne les impuretés, de celle qu'on peut atteindre actuellement et que l'absence de ces impuretés supprime la nécessité d'ajouter des substances particulières comme stabilisants à l'orgotéine purifiée.

La quantité de mannitol qui peut être ajoutée dans les compositions pharmaceutiques de l'invention peut varier dans un domaine très étendu. Au cours des expériences effectuées, on n'a observé aucune limite critique au-dessous ou au-delà de laquelle les propriétés caractéristiques de la composition varient sensiblement.

Il s'est généralement révélé utile d'ajouter un excès pondéral de mannitol. Les compositions préférées contiennent 2 à 10 parties en poids de mannitol par partie en poids d'orgotéine.

891160

On trouvera ci-dessous un exemple de préparation d'une composition pharmaceutique typique conforme à l'invention contenant 3 mg d'orgotéine et 20 mg de mannitol par ampoule de produit lyophilisé.

EXEMPLE 1 -

Préparation de 1000 ampoules de la composition pharmaceutique d'orgotéine (2 mg)/mannitol (20 mg)

On dissout 2200 mg d'orgotéine (surdosage de 10%) dans environ 1/3 du volume d'eau bidistillée apyrogène stérile à froid (4°C) à utiliser pour la préparation. Après dissolution, on filtre la solution en milieu stérile sur membrane Sartorius, type 11308, et on recueille le filtrat dans un récipient stérile refroidi au bain d'eau et de glace. On lave le filtre avec une solution aqueuse contenant la quantité calculée de mannitol nécessaire pour que chaque ampoule en contienne 20 mg.

On porte au volume requis en lavant le filtrat avec de l'eau stérile apyrogène.

Au moyen d'une machine à remplir appropriée, on introduit la solution stérile en quantité mesurée dans des ampoules qui sont réparties automatiquement sur des plateaux pour la lyophilisation et immédiatement congelées à -40°C.

Après la précongélation, les plateaux sont introduits dans l'autoclave de lyophilisation et l'opération est poursuivie pendant 36 heures.

Au terme de la lyophilisation, les fioles sont scellées en chambre stérile à la flamme au moyen d'une machine automatique appropriée.

L'exemple 2 ci-après décrit les expériences effectuées afin d'apprécier la stabilité dans le temps de la composition d'orgotéine et de mannitol préparée comme décrit dans l'exemple 1.

89160

EXEMPLE 2 -Essai de stabilité

On répartit des ampoules de produit lyophilisé préparées comme décrit dans l'exemple 1 et contenant chacune 2 mg d'orgotéine (soit 7700 unités par ampoule pour le surdosage de 10%) en deux groupes qu'on maintient respectivement à +4°C et à la température ambiante (20 à 25°C).

A intervalles déterminés, on prélève des ampoules dans chacun des groupes sur lesquelles on exécute les vérifications analytiques les plus appropriées permettant l'appréciation de la stabilité du produit fini. Ces contrôles décrits en détail ci-après consistent dans la détermination de l'activité de dismutation des peroxydes et dans l'exécution de l'analyse par électrophorèse.

Les résultats obtenus au contrôle périodique poursuivi pendant 27 mois sont rassemblés au tableau suivant:

<u>Temps en mois</u>	<u>Electrophorèse</u>		<u>Activité U.S.</u>	
	<u>Ampoule conservée à</u>		<u>Ampoule conservée à</u>	
	<u>4°C</u>	<u>t.amb.</u>	<u>4°C</u>	<u>t.amb.</u>
0	conforme	conforme	7700	7700
1	"	"	7580	7700
2	"	"	7930	7800
3	"	"	7580	7520
4	"	"	7800	7750
5	"	"	7750	7810
8	"	"	7930	7870
11	"	"	7810	7810
15	"	"	7520	7460
19	"	"	7580	7580
23	"	"	7750	7810
27	"	"	7640	7700

891160

Les variations observées lors des contrôles effectués à différents moments dépendent des limites d'erreur du procédé de détermination de l'activité de dismutation des peroxydes (à exprimer en unités de dismutation des peroxydes U.S.). Comme les résultats rassemblés au tableau le prouvent, les produits en ampoule ont conservé dans les deux cas 100% de l'activité initiale.

2) Contrôles analytiques

a) Activité de dismutation des peroxydes

Définition

Ce procédé est basé sur la réduction aérobie du bleu de tétrazole nitré par le NADH en présence de méthane-sulfonate de phénazine, réduction qui peut être inhibée par la dismutase des peroxydes (R.Fried, Biochemie 57, 657, 1975).

Une unité de dismutase des peroxydes correspond à la quantité d'enzyme requise pour inhiber de 50% la vitesse de réduction du cytochrome C à 25°C et à pH 7,8 (McCord J.M. et Fridovich I.J. Biol. Chem. 244, 6049, 1969).

Réactifs

1) Tampon phosphaté 0,1 M pH = 7,8

On dissout 13,6 g de phosphate sodique monobasique dans environ 800 ml d'eau. On ajoute goutte à goutte une solution d'hydroxyde de sodium 1N jusqu'à un pH final de $7,8 \pm 0,2$.

On porte le volume à 1 litre avec de l'eau.

2) Réactif oxydant

On dissout 83,4 mg de NBT pro analysi (Fluka), 0,83 mg de méthanesulfonate de phénazine et 83,4 μ moles d'EDTA (sel disodique) dans environ 150 ml de tampon phosphaté 0,1M à pH 7,8 dans un matras jaugé de 250 ml (réactif 1).

On prépare séparément par chauffage au bain-marie

une solution de 83,4 mg de gélatine dans 20 à 30 ml du tampon précité. On verse la solution résultante dans le matras de 250 ml et on porte le mélange des réactifs au volume de 250 ml avec le tampon. On filtre si nécessaire et on conserve à l'abri de la lumière et à la température ambiante pendant une durée de 3 heures au cours de laquelle la solution doit être utilisée pour l'analyse.

3) Réactif réducteur

On dissout 7,1 mg de sel disodique de NADH (nicotine- adénine dinucléotide, sel sodique, Boehringer) dans du tampon phosphaté 0,1M (pH 7,8) portant le volume de la solution finale à 10 ml, pour obtenir une solution 1 mM en NADH (100 nanomoles dans 0,1 ml).

Solution standard (S) d'enzyme de dismutation des peroxydes

On pèse exactement 1 à 2 mg de dismutase des peroxydes (Standard Sigma: 2900 unités/mg) qu'on dissout dans du tampon phosphaté 0,1M (pH 7,8) pour obtenir une solution mère de concentration exactement connue d'environ 150 à 200 $\mu\text{g/ml}$, soit 435 à 580 U.S.

Par dilution, on prépare des solutions de concentrations échelonnées (10, 20, 40, 80 et 160 $\mu\text{g/ml}$) qu'on utilise pour l'analyse.

Solutions inconnues (C) d'enzyme de dismutation des peroxydes

On les prépare comme les solutions S en exécutant à peu près les mêmes dilutions à partir de 5 ampoules au moins.

Procédé

On prépare une série de tubes à essai dans chacun desquels on verse 3 ml de réactif 2, 0,1 ml de solution S de différentes dilutions (1, 2, 4, 8 et 16 μg d'enzyme de dismutation de supcroxyde), puis 0,1 ml de réactif 3.

On verse dans un tube 3 ml du réactif 2, 0,1 ml de tampon phosphaté 0,1 N (pH 7,8) et 0,1 ml de réactif 3.

On agite soigneusement chaque tube qu'on conserve à l'obscurité pendant 10 minutes au moins. On détermine l'absorbance de toutes les solutions inconnues à 540 nanomètres en effectuant la lecture contre un blanc constitué par le réactif 2. On reporte l'absorbance sur un graphique en fonction des microgrammes de l'étalon d'enzyme de dismutation des peroxydes, ou unités, pour obtenir de la sorte une courbe d'étalonnage d'inhibition de la réduction aérobie du NBT à l'intervention du NADH. On reportant les couples de valeurs absorbance-unité sur un diagramme semi-logarithmique, on observe une dépendance rectiligne.

Pour la détermination de l'activité de la solution C aux différentes dilutions, on procède de manière analogue. Les lectures effectuées permettent de remonter par la courbe d'étalonnage à l'activité de l'enzyme de dismutation des peroxydes par ampoule.

b) Identification et pureté par analyse électrophorétique

On prépare des gels pour électrophorèse suivant le procédé de Davis en remplaçant dans le gel inférieur un volume d'eau par un volume de riboflavine à 0,004%. On obtient ainsi la composition suivante pour les gels:

1) Gel inférieur de résolution

1 volume	HCl	48 ml
	Tris	36,3 g
	Temed	0,23 ml
	H ₂ O q.s.ad	100 ml
2 volumes	Acrylamide	28 g
	Bis	0,735 g
	H ₂ O q.s.ad	100 ml

1 volume de riboflavine aqueuse à 0,004%

4 volumes de persulfate d'ammonium aqueux à 0,14%.

2) Gel supérieur de concentration

1 volume	{	HCl	48 ml
		Tris	5,98 g
		Temed	0,46 ml
		H ₂ O q.s.ad	100 ml
2 volumes	{	Acrylamide	10 g
		Bis	2,5 g
		H ₂ O q.s.ad	100 g

1 volume de riboflavine aqueuse à 0,004%

4 volumes de saccharose à 40%.

3) Solution tampon: pH 8,3

{	Tris	6 g
	Glycine	28,8 g
	H ₂ O q.s.ad	1000 ml

on dilue à 1:10 avant usage.

Solutions à examiner

On prépare, à partir d'au moins 5 ampoules, une solution à la concentration prévue d'environ 2500 unités par ml dans une solution à 10% de saccharose dans le tampon à pH 8,3 (3) à laquelle on ajoute 1% d'une solution aqueuse à 0,05% de bleu de bromophénol.

Procédé

On dépose 50 microlitres de la solution à examiner sur le gel de concentration et on débute la course d'abord à 1,5 mA par tube et ensuite à 3mA par tube pour la séparation des constituants. La course s'interrompt quand le traceur est arrivé près de la limite inférieure du tube.

On dépose ensuite le gel pour une durée de 20 minutes dans une solution de bleu de tétrazole nitré $2,45 \cdot 10^{-3} M$, puis pour 15 minutes dans une solution de riboflavine 0,028 M dans du 1,4-diaminobutane dans du tampon au phosphate

001150

de potassium 0,036 M à pH 7,8. Après écoulement de 15 minutes, on expose le gel à la lumière d'une lampe de 15 W et on observe la formation d'une coloration violacée sauf à l'endroit où se trouve l'orgotéine. A cet endroit, le gel reste incolore.

Parallèlement à cette détermination, on développe un autre gel avec de l'amidon de Schwartz 0,05% dans de l'acide acétique à 7% pour la détermination des bandes protéiques. L'orgotéine est caractérisée par trois bandes voisines vers le milieu du trajet.

L'exemple 3 ci-après prouve par des données pharmacologiques la supériorité de la composition conforme à l'invention sur l'orgotéine seule pour réduire l'inflammation induite chez le lapin.

EXEMPLE 3 -

On réalise trois préparations différentes A, B et C.

Préparation A

Cette préparation contient de l'orgotéine et du mannitol dans les proportions indiquées dans l'exemple 1, c'est-à-dire 2 mg d'orgotéine et 20 mg de mannitol sous forme lyophilisée.

On dissout le contenu d'une ampoule de produit lyophilisé dans 2 ml de solution physiologique.

Préparation B

La préparation B est analogue à la préparation A avec la seule différence qu'elle ne contient pas de mannitol mais uniquement de l'orgotéine.

Dans ce cas également, on dissout l'orgotéine lyophilisée dans 2 ml de solution physiologique.

Préparation C

La préparation C est formée uniquement de 2 ml de solution physiologique.

On évalue les préparations A, B et C expérimentalement sur le lapin par essai de leur activité anti-inflammatoire relative.

On exécute les expériences sur des lapins mâles type New Zealand de 1,5 à 2 kg.

On induit l'inflammation en injectant dans les deux articulations du genou de la patte antérieure des animaux une composition constituée par 7,5 mg de poly-D-lysine et 7,5 g d'acide hyaluronique. Quatre jours après l'induction de l'arthrite, on répartit les animaux au hasard en groupes de 10 et on leur administre les préparations A, B et C par injection intra-articulaire dans le genou antérieur droit.

Le genou gauche non traité constitue le témoin.

On évalue le degré d'avancement de la réaction inflammatoire en mesurant la circonférence de l'articulation immédiatement avant l'injection de la composition inflammatoire, avant l'administration de l'agent pharmaceutique et ensuite une fois par jour pendant les quatre jours successifs.

Les résultats sont reportés à la Fig. 1 qui montre la diversité d'avancement des inflammations induites chez le lapin par administration :

- d'une solution physiologique (préparation C)
- d'orgotéine (500 μ g) dissoute dans de la solution physiologique (préparation B)
- d'orgotéine et de mannitol dissous dans de la solution physiologique (préparation A) à trois doses différentes d'orgotéine, à savoir 250, 500 et 1000 μ g.

Par dilution convenable, on procède de manière à injecter chaque fois le même volume de solution (1 ml).

Les résultats obtenus démontrent qu'il existe une différence significative et surprenante entre l'effet anti-

89160

inflammatoire de la composition orgotéine/mannitol et la composition d'orgotéine uniquement. En outre, l'effet anti-inflammatoire est proportionnel à la dose d'orgotéine en présence d'un excès constant de mannitol.

7

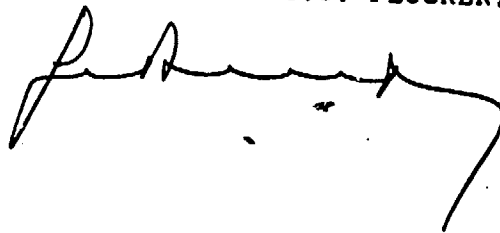
891180

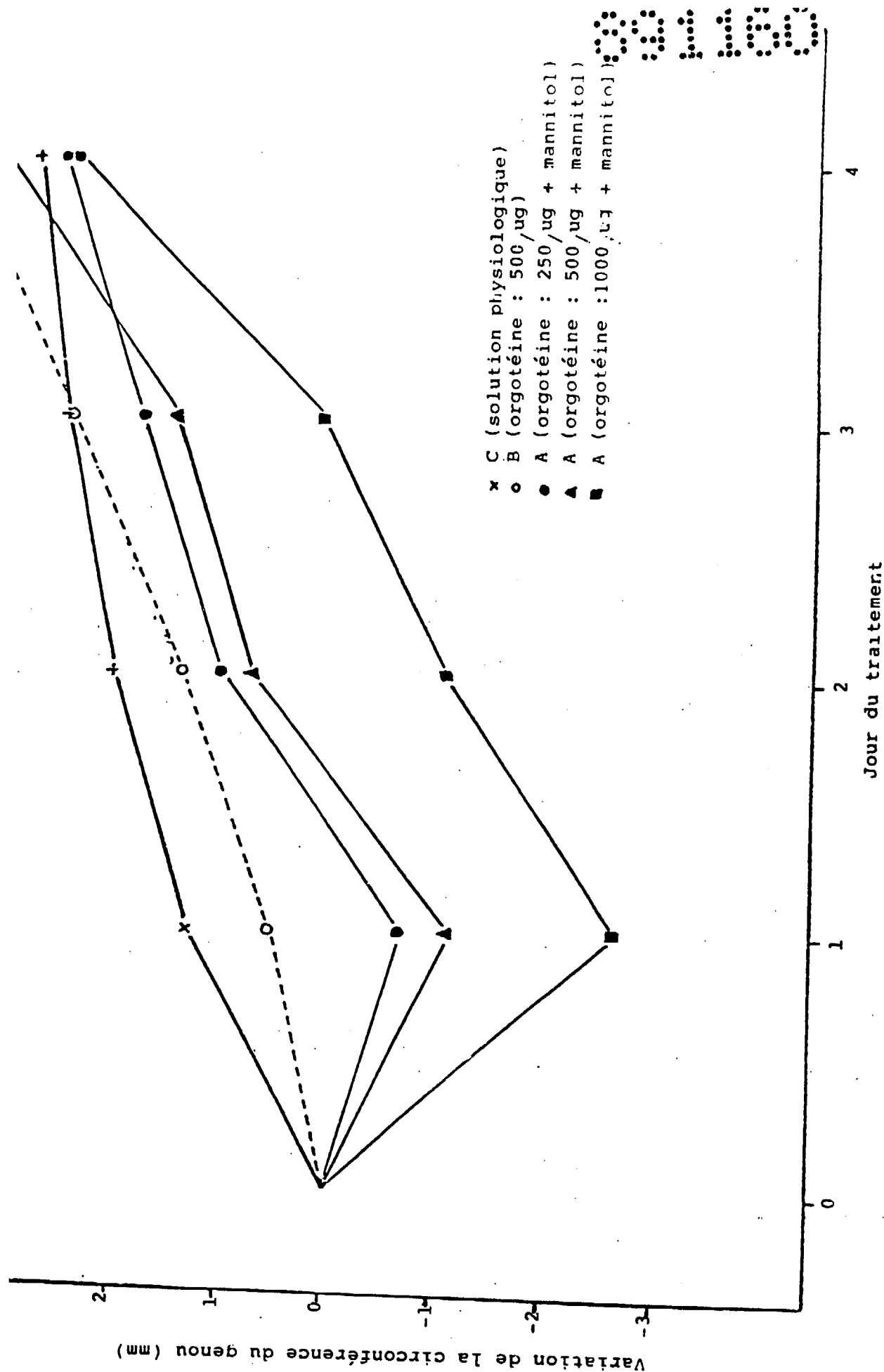
RE V E N D I C A T I O N S

- 1 - Composition à usage thérapeutique, caractérisée en ce qu'elle contient une quantité thérapeutiquement efficace d'orgotéine et un excès pondéral de mannitol.
- 2 - Composition suivant la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle contient 2 à 10 parties en poids de mannitol par partie en poids d'orgotéine.
- 3 - Composition suivant la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est présentée sous forme dosée de médicament.
- 4 - Composition suivant la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle est présentée sous forme de produit lyophilisé dans une ampoule.
- 5 - Ampoule de produit lyophilisé suivant la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle contient 2 mg d'orgotéine et 20 mg de mannitol.

Bruxelles, le 17 novembre 1981

P.Pon.de ISTITUTO FARMACOLOGICO SERONO S.p.A.
OFFICE KIRKPATRICK - G.C. PLUCKER.





Bruxelles, le 17 novembre 1981
 P.Pon.de ISTITUTO FARMACOLOGICO SERONO S.p.A.
 OFFICE KIRKPATRICK - G.C. PLUCKER.