

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
11 juillet 2002 (11.07.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/053090 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : **A61K**
(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/04235

(22) Date de dépôt international :
31 décembre 2001 (31.12.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/17332 29 décembre 2000 (29.12.2000) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
DOSPHARMA [FR/FR]; 3 rue du Tronquet, F-76130
Mont St Aignan (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **RAPIN, Jean-Robert** [FR/FR]; 9 Square de Chatillon, F-75014 Paris (FR). **HALBITTE, Dominique** [FR/FR]; 29 rue du Professeur Patel, F-69009 Lyon (FR).

(74) Mandataire : **CABINET GERMAIN & MAUREAU**;
B.P. 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: MEDICINAL ASSOCIATION OF A BIGUANINE AND A CARRIER, FOR EXAMPLE METFORMIN AND ARGININE

(54) Titre : ASSOCIATION MEDICAMENTEUSE D'UNE BIGUANINE ET D'UN TRANSPORTEUR, PAR EXEMPLE DE METFORMINE ET D'ARGININE

(57) Abstract: The invention concerns a medicinal combination, for treating diabetes, in particular type 2 diabetes, associating a biguanine, in particular a N-dimethylbiguanine, as first medicine, and a carrier agent for said biguanine, as second medicine, said combination comprising: a) a therapeutically active amount of biguanine; b) and an amount of the carrier agent, predetermined to potentiate the therapeutic activity of the biguanine as per (a).

(57) Abrégé : Ensemble médicamenteux, pour le traitement du diabète, en particulier du diabète de type 2, associant une biguanine, en particulier une N-diméthylbiguanine, en tant que premier médicament, et un agent transporteur de ladite biguanine, en tant que second médicament, le dit ensemble comprenant: e) une quantité thérapeutiquement active de la biguanine f) et une quantité de l'agent transporteur, prédéterminée pour potentialiser l'activité thérapeutique de la biguanine selon (a).



WO 02/053090 A2

ASSOCIATION MEDICAMENTEUSE D'UNE BIGUANINE ET D'UN TRANSPORTEUR, PAR EXEMPLE DE METFORMINE ET D'ARGININE

La présente invention concerne une association
5 médicamenteuse, de deux principes actifs, ayant de manière conjointe une
action complémentaire et/ou synergique, et ce pour le traitement du
diabète, en particulier du diabète de type 2.

Par "action complémentaire", on entend l'action
pharmacologique de deux composés différents permettant d'agir sur la
10 même pathologie par deux mécanismes pharmacologiques respectivement
différents, par exemple, l'utilisation combinée de deux antidiabétiques
comme une biguanine et une sulfonyleurée.

Par "action synergique", on entend l'action pharmacologique de
deux composés, consistant à potentialiser l'action d'au moins un desdits
15 composés, par exemple potentialisation de l'action d'une biguanine ou
biguanide (en langue anglaise) par l'action d'un transporteur comme décrit
et proposé ci-après dans l'invention.

On sait que la metformine sous forme de chlorhydrate est le
médicament de première intention dans le traitement des hyperglycémies et
20 du diabète non insulino-dépendant. Ce chlorhydrate de metformine est
utilisé seul ou en association soit avec une sulfonyleurée, soit avec un
inhibiteur de l'alpha amylase, soit encore avec une glitazone.

Le chlorhydrate de metformine à la dose de 50 mg/kg chez le
rat est actif sur les modèles classiques de diabète non insulino-dépendant
25 comme le modèle streptozotocine et le modèle fructose.

Sa biodisponibilité est faible (60%) et son passage intestinal est
préférentiel au niveau du jéjunum et de l'iléon. Cette faible biodisponibilité
explique l'effet secondaire gênant de la metformine que sont les diarrhées.

La metformine est une biguanine très basique et complètement
30 ionisée aux valeurs du pH intestinal. Son passage implique donc un
système physiologique de transporteur, ce qui explique le passage
préférentiel.

La présente invention a pour objet de réduire les effets
secondaires et d'améliorer la biodisponibilité de la metformine en agissant
35 sur ce système physiologique de transporteur.

De façon surprenante, la présente invention a mis en évidence, qu'associée à la metformine, une amine ou une polyamine, ayant une analogie structurale avec une biguanine, et en particulier avec une N-diméthyl-biguanine, présente effectivement ce rôle de transporteur vis-à-vis de la metformine. Plus particulièrement, parmi les transporteurs, l'arginine est préférée en raison de sa similitude de structure chimique avec la metformine. En effet, la L-arginine (cf. fig.3), active elle-même son propre transfert au niveau intestinal. De plus, l'arginine est le précurseur de la synthèse du radical nitroso, NO, qui est reconnu comme un des plus puissants vasodilatateurs, aussi bien au niveau veineux qu'artériel, ainsi que pour ses propriétés hémodynamiques et hémorhéologiques. Cette action propre à l'arginine pourrait être bénéfique sur les pathologies secondaires au développement du diabète, à savoir les macroangiopathies, les microangiopathies, les neuropathies, les néphropathies et les rétinites des diabétiques.

Conformément au document "Marfella R. et al., Metformin improves hemodynamic and rheological responses to L-arginine in NIDDM patients, Diabetes care, 1996 sep 19(9) 934-9", on a décrit une expérimentation chez l'Homme, en dehors de tout protocole clinique ou thérapeutique, consistant à administrer par voie intraveineuse (sous perfusion) une dose totale de 30 g d'arginine en 30 mn, ce qui est énorme et non faisable en thérapeutique courante.

Conformément à ce même document, il a été montré que l'administration conjointe de metformine potentialise l'action hémodynamique et hémorhéologique de l'arginine. Mais à l'inverse, les effets thérapeutiques propres à la metformine, en particulier anti-hyperglycémiques, ne sont pas modifiés par l'arginine.

Ainsi, les résultats obtenus selon l'invention sur des modèles expérimentaux de diabète ont montré que des composés actifs de metformine comprenant dans leur structure un reste arginine, étaient capables d'augmenter la biodisponibilité de la metformine, de manière inattendue, en potentialisant les effets de celle-ci contre l'hyperglycémie, qui est la manifestation principale du diabète.

Toutes les biguanines actuellement utilisées ou en développement dans le traitement du diabète, présentent les effets secondaires et les problèmes de biodisponibilité cités ci-dessus.

Parmi les amines ou polyamines ayant une analogie structurale avec les biguanines, et susceptibles d'être associées en tant que transporteur à ces biguanines, celles étant naturelles pour la physiologie humaine, c'est-à-dire biogéniques, et/ou celles pharmacologiquement et
5 thérapeutiquement actives sont préférées.

Parmi les amines ou polyamines pharmacologiquement et thérapeutiquement actives, celles appartenant à la même classe thérapeutique que la metformine ou celles permettant d'agir sur une pathologie associée au diabète sont préférées.

10 Parmi les amines ou polyamines naturelles pour la physiologie humaine, c'est-à-dire biogéniques, on préférera celles métabolisables, biodégradables par intégration dans un cycle métabolique endogène, en métabolites traditionnels.

La présente invention concerne un ensemble médicamenteux,
15 pour le traitement du diabète, en particulier du diabète de type 2, associant une biguanine, en particulier une N-diméthylbiguanine, en tant que premier médicament, et un agent transporteur de ladite biguanine, en tant que second médicament, le dit ensemble comprenant :

- a) une quantité thérapeutiquement active de la biguanine
- 20 b) et une quantité de l'agent transporteur, prédéterminée pour potentialiser l'activité thérapeutique de la biguanine selon (a).

Elle concerne également un ensemble tel que précédemment défini, caractérisé en ce que la biguanine selon (a) et l'agent transporteur selon (b) sont en quantité équimolaire.

25 Elle concerne également un ensemble tel que précédemment défini, caractérisé en ce que la biguanine est la metformine.

Elle concerne également un ensemble tel que précédemment défini, caractérisé en ce que l'agent transporteur est une amine biogénique, par exemple choisie dans le groupe constitué par l'arginine, la putrescine, la
30 cadaverine, la spermidine, la spermine, et est par exemple la L-arginine.

Elle concerne également un ensemble tel que précédemment défini, caractérisé en ce que la biguanine et/ou l'agent transporteur sont sous une forme adaptée à leur libération contrôlée respectivement.

L'ensemble selon l'invention, chimiquement agencé pour la
35 libération contrôlée d'au moins la biguanine, est également caractérisé en ce qu'il est un composé actif de formule générale A'---V'---C', capable de

restituer au moins l'entité A, par clivage in-vivo de la liaison correspondante entre A' et V', étant spécifié que :

- V est un composé biogénique de vectorisation, de formule générale X-R-Y, dans laquelle,

5 * R représente une chaîne hydrocarbonée de 2 à 10 atomes de carbone, aliphatique, cyclique, ou alicyclique, saturée ou non, éventuellement substituée par des groupes alkyles en C1 à C5, et/ou des groupes hydroxyles,

 * X et Y sont chacun une fonction libre acide, amine, ou alcool.

10 A et C sont deux principes actifs respectivement différents, à savoir la biguanine et le transporteur, dont l'un comprend une fonction chimique complémentaire de la fonction X, susceptible de réagir avec cette dernière pour donner une liaison clivable in-vivo, ionique A' --- V' ou covalente A' — V', et dont l'autre comprend une fonction chimique
15 complémentaire de la fonction Y, susceptible de réagir avec cette dernière pour donner une liaison clivable in-vivo, ionique, V' --- C' ou covalente V' — C'.

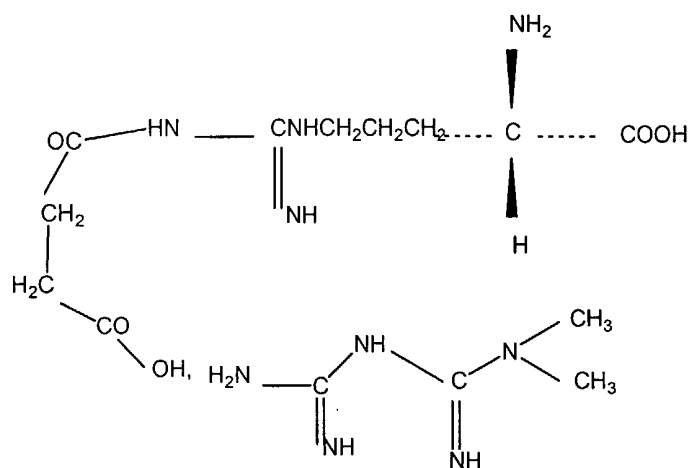
 L'ensemble précédemment défini est dans une variante selon l'invention, caractérisé en ce que, la liaison V' --- C' ou V' — C' est
20 clivable in-vivo, et ledit composé actif est capable de restituer également les entités V et C par ledit clivage in-vivo.

 L'invention concerne également un composé actif tel que défini ci-dessus, A étant la metformine, caractérisé en ce que la metformine est liée au composé biogénique de vectorisation, par salification de la fonction
25 amine primaire terminale de la metformine.

 L'invention concerne également un composé actif tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que C étant l'arginine, l'arginine est liée au composé biogénique de vectorisation V par une réaction d'acylation.

 L'invention concerne également un composé actif tel que défini
30 ci-dessus, caractérisé en ce que V est choisi parmi l'ensemble des diacides constitué par les acides oxalique, malonique, succinique, glutarique, adipique, pimélique, subérique, azélaïque, sébactique, malique, isatique et phtalique et de préférence succinique.

L'invention concerne également un composé actif de formule III



III

L'invention concerne également l'utilisation en tant que médicament d'un composé tel que précédemment défini.

Elle concerne plus particulièrement l'utilisation en tant que médicament d'un composé de formule générale A'---V'---C' tel que défini précédemment.

L'invention concerne également un procédé de préparation d'un composé actif selon l'invention, comprenant les étapes suivantes :

a) réaction de condensation et/ou salification du composé biogénique de vectorisation V avec l'un des principes actifs A ou C,

b) réaction de condensation et/ou salification du produit de la réaction selon (a) avec l'autre principe actif C ou A.

Un autre objet de l'invention est une composition pharmaceutique comprenant au moins un composé selon l'invention, en association avec un ou plusieurs véhicules, diluants, excipients ou adjuvants compatibles et pharmaceutiquement acceptables.

Un autre objet selon l'invention est également une composition pharmaceutique telle que précédemment définie, permettant d'adapter une posologie quotidienne chez l'Homme comprise entre environ 0,2 g et environ 1 g dudit composé actif en une ou plusieurs prises.

Dans l'indication anti-diabétique ou anti-hyperglycémique, un ensemble médicamenteux (ou "kit" de traitement thérapeutique) selon l'invention, et en particulier un composé actif de formule A'---V'---C' tel

que défini précédemment, peuvent être associés à un autre agent anti-hyperglycémique tel qu'une sulfonylurée.

Par "biguanine" (ou "biguanide"), on entend en particulier les N-diméthylbiguanines, substituées ou non, et par exemple la metformine, mais aussi d'autres composés pharmaceutiques, par exemple la buformine, la fenformine.

Préférentiellement, la biguanine est la metformine.

Par "administration simultanée", on entend l'administration en une seule prise des deux principes actifs, étant entendu que l'administration simultanée permet la libération dans l'organisme des deux principes actifs de manière simultanée ou séquencée.

Par "biogénique", on entend un composé chimique d'origine naturelle ou non et/ou métabolisable, et/ou biodégradable, et/ou atoxique vis à vis de l'Homme ou de l'animal, à dose physiologique.

Par "transporteur" on entend une molécule ou substance qui permet le transfert d'une autre molécule à travers une barrière, soit par formation d'une liaison, soit sans formation de liaison, par activation du système de transport, par exemple par induction protéique, activation des systèmes oxygène-dépendants ATPasiques, ou par échange de substance.

Plus particulièrement, par transporteur on entend ici toute molécule ou substance permettant de potentialiser le passage d'une biguanine comme la metformine, et donc d'en faciliter le transport au niveau du jéjunum.

Pour la mise en œuvre d'une association médicamenteuse telle que précédemment définie, différentes solutions d'administration peuvent être considérées, comme par exemple :

- une formulation ou présentation galénique permettant en une seule dose d'administrer, et la biguanine et le transporteur
- ou deux présentations galéniques respectivement différentes, permettant dans un conditionnement approprié d'administrer en même temps et respectivement, et une dose de biguanine, et une dose du transporteur.

De manière tout à fait particulière, et préférée, cette mise en œuvre est effectuée en utilisant un composé actif de formule générale $A'-V'-C'$, capable de restituer les entités A, V et C par clivage in-vivo des liaisons correspondantes entre A', V' et C', étant spécifié que :

- V est un composé biogénique de vectorisation, de formule générale X-R-Y, dans laquelle,

* R représente une chaîne hydrocarbonée de 2 à 10 atomes de carbone, aliphatique, cyclique, ou alicyclique, saturée ou non, éventuellement substituée par des groupes alkyles en C1 à C5, et/ou des groupes hydroxyles,

* X et Y sont chacun une fonction libre acide, amine, ou alcool.

A et C sont deux principes actifs respectivement différents, à savoir la biguanine et le transporteur, dont l'un comprend une fonction chimique complémentaire de la fonction X, susceptible de réagir avec cette dernière pour donner une liaison clivable in vivo, ionique $A' \cdots V'$ ou covalente $A' - V'$, et dont l'autre comprend une fonction chimique complémentaire de la fonction Y, susceptible de réagir avec cette dernière pour donner une liaison clivable in vivo, ionique, $V' \cdots C'$ ou covalente $V' - C'$.

On entend ici par "clivage in vivo" toutes les formes d'hydrolyse chimique, susceptibles d'être observées in-vivo, par exemple, hydrolyse acide, et les hydrolyses enzymatiques, par exemple par des amidases ou des estérases.

Par "fonction chimique complémentaire", on entend toute fonction chimique capable de réagir avec une fonction libre ou terminale du composé biogénique. Par exemple, V doit comporter une fonction réagissant avec A (biguanine) et une fonction réagissant avec C (transporteur). Ainsi si A et C comportent chacun une fonction acide, V est une diamine, un dialcool ou une alcoolamine, de manière à former respectivement un amide, un ester ou un sel. Ainsi si A et C comportent chacun une fonction amine, V est un diacide de manière à former un amide ou un sel. Si A et C comportent chacun une fonction alcool, V est un diacide de manière à former un diester. Avec ce principe, toutes les compositions sont possibles. En conséquence, si A comporte une fonction acide et C une fonction alcool, V est par exemple une alcoolamine, pour agir avec la fonction acide de A pour donner un amide, un ester ou un sel et avec la fonction alcool de C pour donner un ester.

Par "liaisons covalentes", on entend ici des liaisons chimiques susceptibles d'être formées par réaction de fonctions chimiques dites

complémentaires, entre le composé biogénique de vectorisation V et les principes actifs A (biguanine) et C (transporteur).

Par "liaisons ioniques", on entend ici des liaisons par force électrostatique, susceptibles d'être formées par action des fonctions chimiques dites complémentaires, entre le composé biogénique de vectorisation V et les principes actifs A (biguanine) et C (transporteur), donc des liaisons du type sels d'acides, sels d'amines, alcoolates et acide/base, et ce indépendamment de la proportion molaire existant entre le composé V et le principe actif A ou C, appartenant au complexe formé par lesdites liaisons ioniques..

Par "liaison clivable in vivo", on entend toute liaison permettant la libération et restitution des principes actifs A (biguanine) et C (transporteur), et du composé biogénique V de vectorisation, in-vivo, par rupture des liaisons ioniques ou covalentes entre les fonctions chimiques complémentaires de A et V, et de C et V.

Les liaisons covalentes clivables sont clivées par action des enzymes présentes dans le milieu in-vivo du site de libération. Ces liaisons covalentes étant des liaisons amides ou des liaisons esters, les enzymes impliquées dans ce clivage sont des amidases, des estérases et des hydrolases. Ces enzymes sont présentes en particulier dans le tube digestif (administration orale), de façon prépondérante dans le foie, dans le sang, et potentiellement présentes dans les organes cibles.

Les amidases qui hydrolysent la liaison -CO-NH- se trouvent au niveau du foie, elles sont peu actives ; d'où un effet prolongé attendu avec le composé selon l'invention porteur d'une telle liaison. Parmi ces amidases, certaines sont connues, il s'agit des endopeptidases qui hydrolysent les liaisons gamma-aminées ou gamma-acides. V peut être en effet selon l'invention un acide gamma-aminé, avec une seconde fonction acide ou amine en position gamma (cas de l'acide glutamique ou de la lysine par exemple).

Les estérases qui hydrolysent la liaison -CO-O- sont très nombreuses dans l'organisme vivant. Elles sont cependant ubiquitaires et très peu spécifiques d'un substrat, d'où une grande vitesse de réaction, avec une libération rapide des constituants A (biguanine), V, C (transporteur) du composé actif selon la présente invention. Les plus

spécifiques d'un substrat portent le nom de ce substrat, et à ce titre on peut citer par exemple les cholinestérases ou les procaine-estérases.

Les hydrolases hydrolysent également les esters et toutes les molécules de grande taille apportées à l'organisme sous forme d'aliments.

5 Ces hydrolases sont nombreuses et ubiquitaires également. Elles seront néanmoins spécifiques du composé biogénique de vectorisation V utilisé.

Comme enzymes de clivage utiles pour la mise en œuvre de la présente invention, on peut citer les enzymes protéolytiques comme la pepsine, la trypsine, les catalases, les endo- et exo- peptidases. Sont
10 également utiles les amylases et les osidases, et enfin les lipases et les bêta-oxygénases pour la destruction des lipides.

Ces enzymes n'interviennent que lorsque la structure du composé biogénique de vectorisation comprend une ou plusieurs liaisons qu'elles sont susceptibles de cliver. Par exemple, la lipase agit si le
15 composé biogénique de vectorisation est un diacide de longue chaîne (8 à 10 atomes de carbone, le comparant à un acide gras), et que la liaison A - V ou V - C est obtenue par condensation avec une fonction alcool secondaire de A ou de C.

Les liaisons ioniques clivables sont clivées en fonction de leur
20 lieu de libération, par exemple intestin, foie, plasma, ou organe cible, étant entendu que les sels d'acide, d'amine, ou les alcoolates sont généralement ionisés aux pH des milieux des organismes vivants. Généralement le pH est compris entre 2 et 8, et est par exemple 2 pour l'estomac, et de 6 par exemple pour l'intestin.

25 On a donc une ionisation du composé actif selon l'invention, en fonction du type de sel utilisé, et une dissociation dudit composé actif, lorsque ce dernier comporte au moins une liaison ionique. On choisit le sel en fonction de sa constante de dissociation, et du pH du site in-vivo de libération. Par exemple pour une dissociation dans l'estomac, on choisit un
30 sel d'acide faible et de base forte.

Le choix du composé biogénique de vectorisation, et notamment le choix de ses fonctions libres X et Y est fait selon la nature des fonctions chimiques, libres et complémentaires, présentes dans ou sur
35 les principes actifs (biguanide et transporteur) destinés à être vectorisés, c'est-à-dire liés par liaison covalente ou ionique à ce composé biogénique

de vectorisation, mais également selon les sites de clivage et libération choisis. Ce composé biogénique de vectorisation est un produit d'origine naturelle ou non, et/ou métabolisable et/ou biodégradable et/ou atoxique vis-à-vis de l'homme ou de l'animal, à dose physiologique. Ce composé

5 biogénique de vectorisation sera choisi parmi des composés biologiquement éprouvés et décrits, par exemple des gamma-aminoacides intervenant dans la synthèse des protéines, des di-acides intervenant dans le cycle de Krebs, des éthanolamines constitutives de membranes cellulaires, métabolisables et atoxiques, et susceptibles d'être intégrés, eux-mêmes ou leurs

10 métabolites dans les grands cycles biologiques de la vie. On peut citer par exemple à titre de composé biogénique de vectorisation, l'acide succinique que l'on retrouve dans le cycle de Krebs, ou l'acide méthyl-succinique qui est biodégradé en acide succinique.

Les liaisons retenues entre le composé biogénique de

15 vectorisation et les principes actifs associés selon la présente invention, à savoir biguanide et transporteur, dépendent des métabolismes possibles au niveau gastro-intestinal et hépatique.

Par exemple, les sels sont dissociables dans le tube digestif, l'hydrolyse pouvant être retardée par des formes galéniques gastro-

20 résistantes. Les esters sont hydrolysés en milieu acide, ou hydrolysés par les estérases des sucs gastriques, l'hydrolyse pouvant être également retardée par des formes galéniques gastro-résistantes. Les amides sont hydrolysées par les amidases hépatiques, la cinétique de ces hydrolyses étant généralement lente.

25 Différents tests pour évaluer l'aptitude au clivage in-vivo des liaisons $A'-V'$ et $V'-C'$ et à la libération correspondante des principes actifs A (biguanine) et C (transporteur) peuvent être pratiqués. Ces tests consistent par exemple en l'observation de la libération des principes actifs dans un suc intestinal, ou l'étude du métabolisme hépatique sur culture

30 primaire d'hépatocyte de rat. Ces deux tests sont décrits ci-après.

Essai in-vitro de clivage dans un suc intestinal.

On utilise une préparation de suc intestinal contenant la trypsine, les peptidases, la lipase, l'amylase et toutes les autres enzymes

35 du pancréas exocrine. Ce test est préalablement validé avec des composés étalons. Le composé $A'V'C'$ en quantité connue (de l'ordre du

microgramme) est placé en présence d'une quantité connue de suc intestinal (dont les teneurs en trypsine et lipase sont contrôlées). Le mélange réactionnel est maintenu à 37°C pendant une heure. Ce temps est compatible avec le transit intestinal. Des prélèvements sont effectués
5 toutes les 15 mn, et les produits A et C sont détectés et leur concentration est mesurée par HPLC couplée à un détecteur UV, ou un spectromètre de masse s'il n'est pas possible d'utiliser l'UV. Les colonnes utilisées dépendent de la nature de A et de C, mais sont généralement des colonnes échangeuses d'ions, du fait de la présence de formes acides, amines ou
10 alcools libérées. Après étalonnage, on détermine la quantité totale de A (biguanine) ou de C (transporteur) libérée en 1 heure, et les points intermédiaires permettent de calculer les constantes de dissociation K_m et la vitesse V_{max} des enzymes pour le composé actif A'V'C' utilisé. Ce test peut être couplé avec une détermination de la libération de A (biguanine), C
15 (transporteur) et V dans le suc gastrique, en utilisant exactement le même principe mais en remplaçant le suc intestinal par du suc gastrique.

Essai in-vitro sur culture primaire d'hépatocytes de rat.

On utilise une culture primaire d'hépatocytes de rat, qui sont
20 proches de ceux de l'Homme pour les études de métabolisme dans un milieu HEPES, à laquelle on ajoute une quantité connue de composé A'V'C' de l'ordre du microgramme. Les produits sont laissés en contact durant 6 heures, et des prélèvements sont effectués à 1 heure, 2 heures et 4 heures, sur lesquels on isole le surnageant et on lyse les hépatocytes du
25 culot. Dans ces milieux, on mesure les concentrations de principes actifs A (biguanine) et C (transporteur) libérés. Comme précédemment, le calcul de V_{max} et de K_m des enzymes impliquées dans le métabolisme est possible.

Lorsque les composés selon l'invention ne traversent pas les membranes cellulaires, le même type d'étude est réalisable sur un
30 homogénat de foie de rat.

L'éventuelle toxicité du composé biogénique de vectorisation est rapportée à celle du composé actif (A'V'C') selon l'invention. Comme ce composé actif est métabolisé en A (biguanine), C (transporteur) et V et
35 que V est une substance par définition biologique, la toxicité du composé selon l'invention doit se comparer à la somme des toxicités dues à

l'administration de la biguanine A et du transporteur C. De plus, lorsque le composé actif associe deux principes actifs ayant dans ces conditions , au moins pour un dit principe actif, une efficacité supérieure à celle du même dit principe actif seul, on peut considérer une toxicité moindre pour ledit composé. Néanmoins, une méthode de prédictivité de la toxicité, alternative aux méthodes standards in-vivo, est proposée ci-après pour comparer la toxicité de A et de C et de A'---V'---C' à des concentrations identiques exprimées en A ou en C (voir Toxicologic Emergencies, Sixth Edition 1997, Goldfrank et al. Appleton and Lange, Connecticut, USA).

Essai in-vitro de toxicité

Une méthode de culture primaire d'hépatocytes sur 96 heures est mise en oeuvre (voir Biochemical Pharmacology, vol. 50, 1995, pp775-780). Les hépatocytes sont isolés in situ par une perfusion de collagénase. Ils sont ensuite placés dans un milieu de Williams supplémenté en sérum de veau foetal, en cortisol et en glutamine, à raison de 1million de cellules par puits. Dans chaque puits on ajoute des concentrations croissantes et toxiques de A (biguanine) et C (transporteur) et de A'--- V'---C'. Des prélèvements sont effectués après 6h, 12h, 24h, 48h et 96h et la viabilité des cellules est déterminée par un test au bleu de méthylène, par l'expression d'albumine, par l'apoptose des hépatocytes, et par la mesure de l'activité des cytochromes P450.

La viabilité des cellules par le test au bleu de méthylène donne des résultats semblables à ceux obtenus par une DL 50.

Les résultats obtenus par l'expression d'albumine permettent de connaître les limites de tolérance de l'hépatocyte à toute substance toxique (toxicité à terme). En effet, un des rôles principaux de l'hépatocyte est de synthétiser des protéines. Lors d'un effet toxique, cette expression de la synthèse et de la libération d'albumine est altérée.

Les résultats obtenus par l'apoptose des hépatocytes permet de confirmer la toxicité à terme, car lors d'un contact avec une substance toxique, les cellules vont programmer leur destruction, ce qui correspond au phénomène d'apoptose qui est mesuré par l'ADN anormal.

La mesure de l'activité des cytochromes P 450 documente les phénomènes d'induction et d'inhibition de ces enzymes, souvent

rencontrés avec les produits pharmacologiquement actifs. Une série de tests permet de déterminer l'activité des isoformes des cytochromes P 450.

La présente invention concerne encore les variantes suivantes :

5 - A étant la metformine dans la formule générale précitée, la metformine est liée au composé biogénique de vectorisation V, par salification de la fonction amine primaire terminale de la metformine

 - C étant l'arginine dans la formule générale précitée, l'arginine est liée au composé biogénique de vectorisation V par une réaction
10 d'acylation

 - V, dans la formule générale précitée, est choisi dans l'ensemble des diacides constitué par les acides oxalique, malonique, succinique, glutarique, adipique, pimélique, subérique, azélaïque, sébactique, malique, isatique et phtalique et de préférence succinique.

15 L'invention concerne aussi, en tant que médicament, le composé de formule III.

 L'invention concerne aussi toute composition pharmaceutique comprenant un composé actif tel que précédemment défini, en association avec un ou plusieurs véhicules, diluants, excipients ou adjuvants
20 compatibles et pharmaceutiquement acceptables. Préférentiellement, une telle composition pharmaceutique permet d'adapter une posologie quotidienne chez l'homme, comprise entre 0,2 g et 1 g de chaque principe actif (biguanine et transporteur), en une ou plusieurs prises. Par exemple, des formes galéniques gastrorésistantes peuvent être mises en œuvre pour
25 éviter toute hydrolyse au niveau de l'estomac.

 Préférentiellement, un composé actif tel que défini précédemment peut être obtenu au terme des étapes suivantes :

 * réaction de condensation et/ou salification du composé biogénique de vectorisation (V) avec l'un (A ou C) des principes actifs,
30 * réaction de condensation et/ou salification dudit composé biogénique condensé et/ou salifié obtenu avec l'autre principe actif (C ou A).

 Classiquement, les réactions de condensation pouvant être utilisées sont les réactions d'acylation des amines et d'esterification des
35 alcools.

Lorsque l'un (A ou C) au moins des principes actifs (biguanine ou transporteur) est lié au composé biogénique de vectorisation V par une réaction de salification, la séquence de mise en œuvre des réactions comprendra de préférence la réaction de condensation puis la réaction de salification, pour des raisons de stabilité des sels en fonction du pH, bien connues de l'homme de l'art.

Lorsque A est la metformine, C est l'arginine et V est l'acide succinique, le procédé de préparation comprend les étapes suivantes :

- réaction du monochlorure monoester de l'acide succinique en solution dans de l'éther ou dans du benzène, avec l'arginine en solution aqueuse dans du carbonate de sodium.

- libération de la metformine base à partir du chlorhydrate en milieu sodique concentré et extraction par de l'alcool absolu

- formation du sel de l'hémisuccinimide d'arginine avec la metformine.

De préférence, les compositions pharmaceutiques selon l'invention sont adaptées sous une forme appropriée pour l'administration par voie orale, parentérale ou intraveineuse.

L'invention a plus particulièrement pour objet, l'utilisation d'au moins un composé actif tel que décrit ci-dessus, pour l'obtention de médicaments destinés au traitement du diabète sous toutes ses formes et/ou au traitement des maladies du système circulatoire, que ces maladies soient liées ou non au diabète.

La présente invention est maintenant décrite à titre d'exemple, par référence à l'association de metformine (biguanine) et d'arginine (transporteur) dans un même composé actif A'V'C', V étant l'acide succinique réagissant, d'un côté de manière covalente avec une fonction amine de l'arginine et de l'autre côté de manière ionique (réaction de salification) avec une fonction amine de la metformine.

Synthèse de l'hémisuccinimide d'arginine-hémisuccinate de metformine

a) Première étape : préparation de l'hémisuccinimide d'arginine.

De l'arginine base (6g) est dissoute dans 120 ml d'une solution aqueuse de carbonate de sodium (N = 10,6 g/100ml). Par ailleurs, du monochlorure-monoester succinique est dilué dans 50 ml d'éther sulfurique, en léger excès de monochlorure monoester succinique pour une

réaction mole à mole par rapport à l'arginine. Sous agitation vigoureuse à température ambiante, la solution étherée est ajoutée à la solution aqueuse en 10 minutes. Le liquide réactionnel est conservé sous agitation vigoureuse pendant une heure, en chauffant lentement pour une distillation
5 complète de l'éther. On évapore à sec et le résidu est repris par un minimum d'eau distillée (20 ml), et acidifié par de l'acide chlorhydrique dilué. Par concentration (chauffage léger sous vide partiel) on obtient des cristaux blancs d'hémisuccinimide d'arginine.

La vérification du spectre RMN, de l'analyse centésimale et de
10 la pureté du produit par chromatographie sur couche mince est réalisée. On vérifie en particulier la présence du reste acide aminé de l'arginine par la réaction à la ninhydrine et la présence du carboxyle libre de l'acide succinique par titrimétrie.

Le rendement est quantitatif.

15

b) Deuxième étape : libération de la metformine base.

10 grammes de chlorhydrate de metformine sont ajoutés à 40 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium 5 N. Le mélange réactionnel est chauffé pendant deux heures à 40°C. Après évaporation sous vide à
20 40°C, le résidu visqueux est repris par 100 ml d'éthanol absolu. Une filtration permet d' éliminer les impuretés et il reste un résidu non soluble de chlorure de sodium. La metformine base est en solution alcoolique et par évaporation elle est isolée sous forme d'une poudre visqueuse. Le spectre RMN confirme la structure de la metformine. L'absence de chlorure est
25 vérifiée au nitrate d'argent.

On rappelle que la metformine, c'est à dire la N,N-diméthyl-imidodicarbonimidique diamide, est identifiée dans le MERCK Index sous le numéro 5792 et caractérisée sous le numéro Chemical Abstracts 657-24-9.

30

c) Troisième étape

Dans une solution aqueuse d'hémisuccinimide d'arginine, la metformine base est ajoutée mole à mole. Une dissolution immédiate est obtenue.

L'eau est complètement évaporée à 60°C sous vide. Le résidu est remis en solution dans de l'eau distillée et cristallise lors de la concentration sous vide.

On obtient des cristaux translucides solubles dans l'eau et insolubles dans les solvants organiques. Le point de fusion est de 188-189° C.

Le spectre RMN, l'analyse centésimale et la présence d'une seule tache après chromatographie sur couche mince confirme la structure et la pureté du produit. Le rendement total est quantitatif.

A la suite des réactions précédentes, le rendement est voisin de 90%. Les pertes proviennent des purifications et filtrations.

Les formules développées de l'arginine, de la metformine, et du sel de l'hémisuccinimide d'arginine avec la metformine sont données respectivement aux figures 1 à 3.

Test de clivage :

Ce test est réalisé selon la méthode in-vitro dans un suc intestinal, décrite précédemment selon l'essai in-vitro de toxicité décrit. On observe une libération immédiate de la metformine sans modifier la partie hémisuccinimide-d'arginine. Un deuxième essai est réalisé sur une culture d'hépatocytes de rat, selon la méthode décrite précédemment. On observe une libération lente d'arginine sur 24 heures.

Toxicité :

Ce test est réalisé selon l'essai in-vitro de toxicité décrit précédemment. La dose toxique est observée avec la metformine à 10^{-2} M, et elle est identique pour le composé actif A'-V'-B', à savoir le sel de l'hémisuccinimide d'arginine avec la metformine..

Vérification de l'activité pharmacologique du composé actif obtenu.

L'intérêt cinétique et pharmacologique du composé actif selon la présente invention est décrit ci-après, en prenant comme exemple illustratif, l'hémisuccinimide d'arginine-hémisuccinate de metformine, et une association chlorhydrate de metformine/chlorhydrate d'arginine :

a) Une étude pharmacocinétique menée dans deux groupes de 20 rats chacun, recevant par voie orale, respectivement 50 mg/kg de chlorhydrate de metformine, et 50 mg/kg d'hémisuccinimide d'arginine-hémisuccinate de metformine a permis de calculer les différents paramètres cinétiques. L'hémisuccinimide d'arginine-hémisuccinate de metformine libère de la metformine et dans les deux groupes, ce sont les taux plasmatiques de la metformine qui sont déterminés.

Après administration de 50 mg/kg de chlorhydrate de metformine, le pic de concentration est observé en 90 minutes et est trouvé égal à 3,9 µg/ml. La fraction biodisponible est de 60% et la demi-vie est égale en moyenne à 2,5 heures.

L'administration de 50 mg/kg d'hémisuccinimide d'arginine-hémisuccinate de metformine correspond à environ 25 mg/kg de chlorhydrate de metformine soit à une demi-dose. Le pic de concentration est observé à 60 minutes et il est trouvé égal à 2,9 µg/ml de metformine. La fraction biodisponible est de 75% et la demi-vie est de 2,6 heures.

Ces résultats démontrent que le passage de la metformine (quantité totale et vitesse de transfert) est amélioré dans le cas de l'hémisuccinimide d'arginine-hémisuccinate de metformine.

Du point de vue pharmacologique, l'activité antidiabétique a été étudiée sur deux modèles de rats rendus diabétiques.

Le premier modèle consiste à traiter les rats par de la streptozotocine (50mg/kg IP), composé qui induit une augmentation de la glycémie qui passe de 5,5 mM à 12-14 mM en 21 jours. L'administration de metformine (30 mg/kg) diminue significativement cette hyperglycémie qui passe de 12,11 à 9,85 mM en moyenne. A la même posologie de 30 mg/kg (environ deux fois moins de metformine base), l'hémisuccinimide d'arginine-hémisuccinate de metformine diminue de façon plus importante l'hyperglycémie qui passe de 12,66 à 7,56 mM. La différence entre les deux traitements est significative en dépit de la plus faible dose de metformine.

Le second modèle est réalisé avec l'administration de fructose à 10% dans l'eau de boisson des rats pendant trois semaines. Il se développe une insulino-résistance, suivie d'un diabète de type non insulino-résistant. L'hémisuccinimide d'arginine-hémisuccinate de metformine se révèle significativement plus actif que la metformine seule à dose

équivalente en metformine base et l'action est plus rapide comme montré dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 :

	Metformine 30 mg/kg/jour	Arginine 30 mg/kg/jour	Hémisuccinimide d'arginine-hémisuccinate de metformine 70 mg/kg/jour
Contrôle (glycémie mM)	6,94 ± 0,13	6,87 ± 0,14	6,84 ± 0,06
21 jours fructose (glycémie mM)	12,52 ± 0,52	13,24 ± 0,62	12,14 ± 0,28
4 jours traitement (glycémie mM)	13,41 ± 0,52	14,37 ± 0,20	10,92 ± 0,44
8 jours traitement (glycémie mM)	10,83 ± 0,64	12,56 ± 0,89	9,13 ± 0,64
12 jours traitement (glycémie mM)	9,78 ± 0,72	11,98 ± 0,71	8,43 ± 0,52
21 jours traitement (glycémie mM)	9,87 ± 0,68	10,73 ± 1,27	7,76 ± 0,78

5

L'activité antidiabétique a également été vérifiée sur des hamsters rendus diabétiques par l'administration pendant trois mois de fructose. Sur ce modèle l'hémisuccinimide d'arginine-hémisuccinate de metformine se révèle significativement plus actif que la metformine seule à dose égale de 10 mg/kg/jour pour les deux produits après deux semaines de traitement on obtient les résultats illustrés dans le tableau 2 suivant :.

10

Tableau 2 :

15

	Fructose 3 mois	Fructose + Metformine 10 mg/kg/jour	Fructose + Hémisuccinimide d'arginine-hémisuccinate de metformine 10 mg/kg/jour
2 semaines traitement (glycémie mg/dl)	143	112	93

Glycémie de contrôle sans fructose : 91 mg/dl

Une étude sur la poche jugale du hamster montre que l'hémisuccinimide d'arginine-hémisuccinate de metformine reproduit au moins les effets des deux principes actifs sur la microcirculation, à savoir l'action vasodilatatrice de l'arginine et l'action sur la vasomotion de la metformine.

5

REVENDICATIONS

1. Ensemble médicamenteux, pour le traitement du diabète, en particulier du diabète de type 2, associant une biguanine, en particulier une N-diméthylbiguanine, en tant que premier médicament, et un agent transporteur de ladite biguanine, en tant que second médicament, le dit ensemble comprenant :

- c) une quantité thérapeutiquement active de la biguanine
- d) et une quantité de l'agent transporteur, prédéterminée pour potentialiser l'activité thérapeutique de la biguanine selon (a).

2. Ensemble selon la revendication 1, caractérisé en ce que la biguanine selon (a) et l'agent transporteur selon (b) sont en quantité équimolaire.

3. Ensemble selon la revendication 1 caractérisé en ce que la biguanine est la metformine.

4. Ensemble selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'agent transporteur est une amine biogénique, par exemple choisie dans le groupe constitué par l'arginine, la putrescine, la cadaverine, la spermidine, la spermine, et est par exemple la L-arginine.

5. Ensemble selon la revendication 1 caractérisé en ce que la biguanine et/ou l'agent transporteur sont sous une forme adaptée à leur libération contrôlée respectivement.

6. Ensemble selon la revendication 5, chimiquement agencé pour la libération contrôlée d'au moins la biguanine, caractérisé en ce qu'il est un composé actif de formule générale $A'-V-C'$, capable de restituer au moins l'entité A, par clivage in-vivo de la liaison correspondante entre A' et V', étant spécifié que :

- V est un composé biogénique de vectorisation, de formule générale X-R-Y, dans laquelle,

* R représente une chaîne hydrocarbonée de 2 à 10 atomes de carbone, aliphatique, cyclique, ou alicyclique, saturée ou non, éventuellement substituée par des groupes alkyles en C1 à C5, et/ou des groupes hydroxyles,

* X et Y sont chacun une fonction libre acide, amine, ou alcool.

A et C sont deux principes actifs respectivement différents, à savoir la biguanine et le transporteur, dont l'un comprend une fonction chimique complémentaire de la fonction X, susceptible de réagir avec cette dernière pour donner une liaison clivable in-vivo, ionique A' --- V' ou covalente A' — V', et dont l'autre comprend une fonction chimique complémentaire de la fonction Y, susceptible de réagir avec cette dernière pour donner une liaison clivable in-vivo, ionique, V' --- C' ou covalente V' — C'.

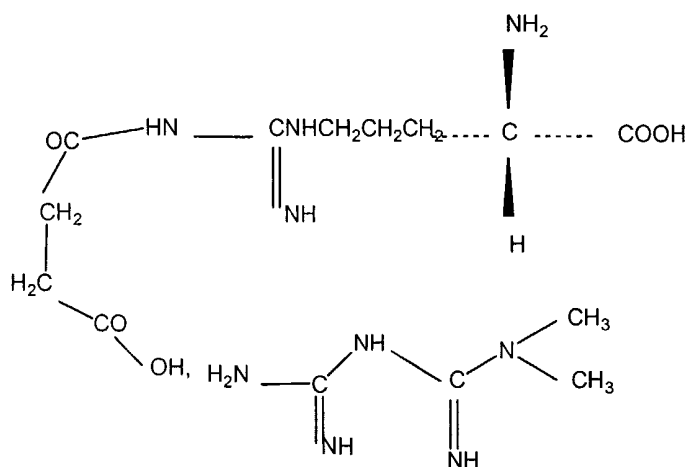
7. Ensemble selon la revendication 6, caractérisé en ce que, la liaison V' --- C' ou V' — C' est clivable in-vivo, et ledit composé actif est capable de restituer également les entités V et C par ledit clivage in-vivo.

8. Composé actif selon la revendication 7, A étant la metformine, caractérisé en ce que la metformine est liée au composé biogénique de vectorisation, par salification de la fonction amine primaire terminale de la metformine.

9. Composé actif selon la revendication 7, caractérisé en ce que C étant l'arginine, l'arginine est liée au composé biogénique de vectorisation V par une réaction d'acylation.

10. Composé actif selon la revendication 6, caractérisée en ce que V est choisi parmi l'ensemble des diacides constitué par les acides oxalique, malonique, succinique, glutarique, adipique, pimélique, subérique, azélaïque, sébactique, malique, isatique et phtalique et de préférence succinique.

11. Composé de formule III



12. Utilisation en tant que médicament d'un composé selon la revendication 11.

13. Utilisation en tant que médicament d'un composé de formule générale A'---V'---C' selon la définition de la revendication 6.

5 14. Procédé de préparation d'un composé actif selon l'une quelconque des revendications 6 à 11, comprenant les étapes suivantes :

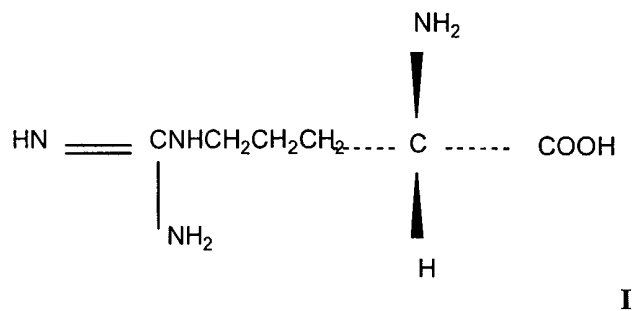
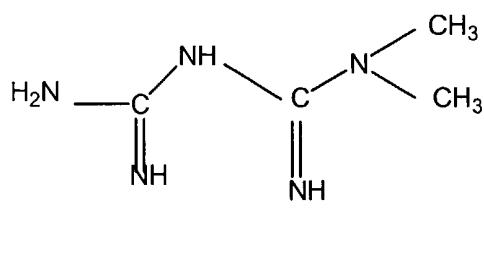
a) réaction de condensation et/ou salification du composé biogénique de vectorisation V avec l'un des principes actifs A ou C,

10 b) réaction de condensation et/ou salification du produit de la réaction selon (a) avec l'autre principe actif C ou A.

15 15. Composition pharmaceutique comprenant au moins un composé selon la revendication 6, en association avec un ou plusieurs véhicules, diluants, excipients ou adjuvants compatibles et pharmaceutiquement acceptables.

16. Composition pharmaceutique selon la revendication 15, permettant d'adapter une posologie quotidienne chez l'Homme comprise entre environ 0,2 g et environ 1 g dudit composé actif, en une ou plusieurs prises.

FIGURES

Figure 1 :*FORMULE I : ARGININE***Figure 2 :***FORMULE II : METFORMINE***Figure 3 :***FORMULE III : HEMISUCCINIMIDE D'ARGININE-HEMISUCCINATE DE METFORMINE*