



(12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 31927 B1**
- (43) Date de publication : **01.12.2010**
- (51) Cl. internationale : **A61K 9/00; A61K 9/08;
A61K 9/20; A61K 47/02;
A61K 38/00**
-
- (21) N° Dépôt : **32934**
- (22) Date de Dépôt : **18.06.2010**
- (30) Données de Priorité : **19.12.2007 FR 0759971**
- (86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT : **PCT/FR2008/052357 18.12.2008**
- (71) Demandeur(s) : **FARID BENNIS, 74, RUE DU CORAIL, VILLA ANDALOUZA, PARANFA CASABLANCA 21000 (MA)**
- (72) Inventeur(s) : **BENNIS, Farid ; SERRANO, Jean-Jacques**
- (74) Mandataire : **M. MEHDI SALMOUNI-ZERHOUNI**
-
- (54) Titre : **COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES RENFERMANT AU MOINS UN PRINCIPE ACTIF PROTEINIQUE PROTEGE DES ENZYMES DIGESTIVES**
- (57) Abrégé : La présente invention concerne des compositions pharmaceutiques renfermant au moins un principe actif protéinique protégé des enzymes digestives. Lesdites compositions pharmaceutiques renferment ledit au moins un principe actif, sous forme libre, ainsi que, liquides, un système capable de les tamponner à un pH supérieur à 4 et inférieur ou égal à 8, ou, solides, un système susceptible d'exercer, lors de leur mise en milieu liquide, un effet tampon entre un pH supérieur à 4 et un pH inférieur ou égal à 8.

Abrégé

La présente invention concerne des compositions pharmaceutiques renfermant au moins un principe actif protéinique protégé des enzymes digestives. Lesdites compositions pharmaceutiques renferment ledit au moins un principe actif, sous forme libre, ainsi que, liquides, un système capable de les tamponner à un pH supérieur à 4 et inférieur ou égal à 8, ou, solides, un système susceptible d'exercer, lors de leur mise en milieu liquide, un effet tampon entre un pH supérieur à 4 et un pH inférieur ou égal à 8.

Compositions pharmaceutiques renfermant au moins un principe actif protéinique protégé des enzymes digestives.

La présente invention a pour principal objet des compositions, compositions pour utilisation comme médicaments ou compositions pharmaceutiques, renfermant au moins un principe actif protéinique protégé des enzymes digestives. Au sein desdites compositions, ledit au moins un principe actif est formulé de façon à résister, en l'état, à sa métabolisation en milieu gastrique et en milieu intestinal. Lesdites compositions sont des compositions pour administration par voie orale (*via* le tractus gastro-intestinal) dudit au moins un principe actif protéinique (sensible aux enzymes digestives).

A ce jour, les principes actifs protéiniques, donc sensibles aux enzymes digestives, notamment l'insuline et ses analogues (plus précisément sensibles aux protéases, telle la pepsine dans l'estomac et principalement la trypsine dans l'intestin), sont encore essentiellement administrés par voie parentérale malgré les nombreuses recherches qui ont été menées pour proposer des voies de délivrance alternatives (notamment plus confortables pour les patients).

L'article de Simona Cernea et Itamar Raz, paru dans *Timely Top. Med. Cardiovasc. Dis.* 2006 Nov. 1 ; Vol 10: E29, faisait, en 2006, un point sur les formes d'administration, alternatives à l'injection, de l'insuline. De nombreux documents brevets, par exemple WO 85/05029, US 5,824,638 et WO 2006/127361, existent également sur le sujet.

Les travaux les plus avancés seraient ceux relatifs à l'administration par voie nasale. Cette voie d'administration serait en effet moins contraignante techniquement que la voie parentérale. La muqueuse nasale, richement vascularisée, présente la capacité d'absorber les protéines et de les transmettre au système sanguin, ce qui en fait un candidat potentiellement intéressant. Cependant, elle souffre d'une certaine difficulté à contrôler la dose délivrée par les inhalateurs en fonction des patients (notamment en cas de rhume...).

Selon l'art antérieur, on a plus généralement décrit des principes actifs protéiniques modifiés chimiquement, des principes actifs protéiniques formulés, selon de nombreuses variantes. Ainsi :

- le brevet US 4,692,433 décrit l'administration par voie orale d'hormones polypeptidiques. Lesdites hormones sont administrées,

avantageusement en solutions aqueuses tamponnées, encapsulées dans un liposome. Elles ne sont pas administrées sous forme libre ;

- les documents WO 97/33531, WO 02/072075 et US 2003/0017203 décrivent des formes gastro-résistantes pour l'administration par voie orale de peptides. Ces formes associent un enrobage gastro-résistant et un agent réducteur de pH. Ledit enrobage protège le principe actif lors de son passage dans l'estomac. Une fois arrivé dans le compartiment intestinal, ledit enrobage est dissous, libérant à la fois le principe actif et l'agent réducteur de pH. De part l'action dudit agent réducteur de pH, le pH de l'intestin est localement abaissé, réduisant de fait l'activité protéolytique des protéases intestinales présentes. La protection au niveau de l'estomac et à l'entrée de l'intestin est donc assurée par deux moyens différents, qui développent successivement leur action. Les peptides en cause n'interviennent ni sous forme libre, ni en présence d'un tampon. On peut incidemment noter ici que le tableau 1, présenté en page 23 de la demande WO 97/33531, montre des résultats de biodisponibilité de solutions tamponnées de calcitonine. Les tests ont été réalisés pour étudier l'influence du pH de la solution administrée localement (directement dans l'intestin de rats) sur l'absorption du principe actif. Ces tests ont été réalisés en vue d'optimiser la nature de l'agent réducteur de pH intervenant dans la forme gastro-résistante proposée. Ces tests ne décrivent, ni ne suggèrent, les compositions (compositions pharmaceutiques ou médicaments) orales de l'invention, décrites ci-après ;

- la demande US 2002/0132757 concerne l'administration de la calcitonine, sous la forme de particules solides, au travers de membranes épithéliales, au travers des muqueuses buccales ou nasales. Pour ce type spécifique d'administration, qui n'implique pas de tractus gastro-intestinal, le principe actif est traité comme suit. Il est préalablement dissous dans un tampon (simple auxiliaire de fabrication). La solution obtenue, additionnée de tensio-actif(s) et agent(s) améliorant l'absorption est lyophilisée. Les particules sèches obtenues sont finalement conditionnées dans un container sous pression avec un solvant ou véhicule adéquat (éthanol, par exemple). Ce solvant ou véhicule a pour fonction de disperser sous pression lesdites particules sur une surface, la plus grande

possible, des muqueuses. Lesdites particules ne sont pas administrées en présence d'un tampon ;

- la demande US 2007/0154559 décrit un procédé compliqué de formulation de principes actifs, destinés à l'administration par voie orale. Une absorption gastro-intestinale améliorée est recherchée. L'absorption en cause est celle de nanoparticules qui renferment lesdits principes actifs. Selon le procédé décrit, le principe actif est tout d'abord dissous dans un tampon (simple auxiliaire de fabrication) puis complexé avec un contre-ion. Le complexe obtenu est mis en solution, en présence d'un polymère et d'un lipide, dans un solvant organique. Une émulsion est ensuite générée entre la solution organique obtenue et une solution aqueuse contenant un agent émulsifiant. Les nanoparticules sont finalement formées par évaporation dudit solvant organique. Le principe actif n'est ainsi administré, ni sous forme libre, ni en présence d'un tampon ;

- la demande WO 2007/032018 décrit un procédé compliqué de formulation de principes actifs, destinés à l'administration par voie orale, du même type que celui décrit dans la demande US ci-dessus. Le principe actif est également délivré sous forme de nanoparticules. Lesdites nanoparticules (à base d'un acide gras et d'un polymère) sont sensibles au pH. Elles se rétractent à pH acide. Le principe actif se trouve ainsi mieux protégé lors de son passage dans l'estomac. Ledit principe actif n'est ici encore administré, ni sous forme libre, ni en présence d'un tampon ;

- la demande FR 2 123 524 décrit un dérivé d'insuline obtenu par acylation. La réaction chimique en cause est mise en œuvre en milieu tampon. La demande WO 01/36656 décrit un complexe biomolécule/acide hyaluronique. Ces deux documents de l'art antérieur ne décrivent, ni ne suggèrent, des compositions pharmaceutiques associant leur principe actif sous forme libre et un système tampon protecteur.

On a ci-dessus rendu compte de l'enseignement des documents de l'art antérieur évoqués, en référence aux notions de composition orale, de forme libre du principe actif protéinique et de tampon, dans la mesure où lesdites notions constituent le fondement de la présente invention, décrite ci-après.

Le problème technique de l'administration par voie orale d'un principe actif protéinique (donc sensible aux enzymes digestives) est double dans la mesure où le système de protection proposé doit *a priori*

être efficace tant au niveau de l'estomac qu'à l'entrée de l'intestin. Il doit *a priori* résister tout d'abord au suc gastrique, puis ensuite au suc pancréatique. En effet, à la sortie de l'estomac, au niveau du pylore, lorsque le chyme acide se déverse dans le duodénum, la sécrétine est libérée de l'intestin et va stimuler le pancréas pour d'une part la sécrétion de bicarbonate (afin de diminuer l'acidité dudit chyme) et d'autre part la sécrétion de la cholécystokinine, pancréoenzyme qui elle, stimule la sécrétion du suc pancréatique riche en enzymes (trypsinogène, chymotrypsinogène, transformées en trypsine et chymotrypsine activées par une entérokinase). Une fois l'acidité neutralisée dans le duodénum par la sécrétine hydrocarbonatée, il y a alors rétrocontrôle et inhibition des sécrétions pancréatiques. Ce mécanisme normal de la digestion est familier à l'homme du métier.

Confrontés audit problème technique de l'administration par voie orale d'un principe actif protéinique, les inventeurs proposent une solution tout à fait originale, non pas basée sur un système de double protection mais sur un système de protection au niveau de l'estomac qui inhibe également la sécrétion pancréatique (qui supprime le problème de la dégradation du principe actif au niveau de l'entrée de l'intestin). Les inventeurs proposent *a posteriori* cette explication des bons résultats obtenus avec les compositions de l'invention. Le système de protection original proposé est un système tampon. De façon tout à fait surprenante, ledit système de protection original, système tampon, autorise l'administration, par voie orale (*via* le tractus gastro-intestinal), du principe actif protéinique, sous forme libre.

Selon son premier objet, la présente invention concerne donc de nouvelles compositions pour utilisation comme médicament ou compositions pharmaceutiques, destinées à (convenant à) l'administration par voie orale d'au moins un principe actif protéinique, tamponnées.

Plus précisément, les compositions de l'invention se présentent sous forme liquide ou solide. Il s'agit de compositions orales et elles renferment au moins un principe actif protéinique. Elles conviennent à l'administration par voie orale dudit principe actif.

De façon caractéristique, lesdites compositions :

- liquides, renferment un système (système tampon) capable de les tamponner à un pH supérieur à 4 et inférieur ou égal à 8 ;

- solides, renferment un système (système tampon) susceptible d'exercer, lors de leur mise en milieu liquide, généralement aqueux, un effet tampon entre un pH supérieur à 4 et un pH inférieur ou égal à 8.

Selon son premier objet, la présente invention concerne donc :

- 5 - des compositions, sous forme liquide ou solide, qui renferment :
au moins un principe actif protéinique sous forme libre, ainsi que,
liquides, un système (système tampon) capable de les tamponner à un pH
supérieur à 4 et inférieur ou égal à 8 ou, solides, un système (système
10 tampon) susceptible d'exercer, lors de leur mise en milieu liquide, un effet
tampon entre un pH supérieur à 4 et un pH inférieur ou égal à 8,
pour utilisation comme médicaments, pour administration par voie orale
(*via* le tractus gastro-intestinal) dudit au moins un principe actif
protéinique ;
- des compositions pharmaceutiques, sous forme liquide ou solide, pour
15 administration par voie orale (*via* le tractus gastro-intestinal), renfermant
au moins un principe actif protéinique, qui renferment ledit principe actif
protéinique, sous forme libre, ainsi que, liquides, un système (système
tampon) capable de les tamponner à un pH supérieur à 4 et inférieur ou
égal à 8, ou, solides, un système (système tampon) susceptible d'exercer,
20 lors de leur mise en milieu liquide, un effet tampon entre un pH supérieur
à 4 et un pH inférieur ou égal à 8.

Lesdites compositions de l'invention sont susceptibles d'être
obtenues par (simple) formulation, dudit au moins un principe actif
protéinique sous forme libre, avec un système (système tampon) capable
25 de les tamponner, sous forme liquide, à un pH supérieur à 4 et inférieur
ou égal à 8 ou, sous forme solide, avec un système (système tampon)
susceptible d'exercer, lors de leur mise en milieu liquide de ladite forme
solide, un effet tampon entre un pH supérieur à 4 et un pH inférieur ou
égal à 8.

30 De façon caractéristique, les compositions de l'invention,
liquides ou solides (monophasiques, en tout état de cause) sont des
compositions orales, qui associent en leur sein au moins un principe actif
protéinique sous forme libre et un système tampon. Ledit système tampon
permet, comme indiqué ci-dessus, l'administration par voie orale du
35 principe actif protéinique, sous forme libre. Il est efficace pour protéger
ladite forme libre lors du tractus gastro-intestinal.

Au sein des compositions de l'invention, le principe actif protéinique est donc présent, "en l'état", non protégé *per se*, notamment par une barrière physique... Il est présent tel que ou en simple mélange avec des excipients nécessaires à sa formulation. Par forme libre dudit

5 principe actif, on entend notamment ledit principe actif sans système physique de protection, plus ou moins complexe, type revêtement, enrobage, matrice, paroi de capsule (ledit principe actif n'est ni revêtu, ni enrobé, ni matricé, ni encapsulé (notamment dans des liposomes)...).

Le système tampon, au vu des valeurs de pH énoncées, est

10 capable de tamponner les compositions de l'invention en milieu gastrique et en milieu intestinal. Il est évidemment capable d'exercer son effet tampon pendant la durée de la digestion : pendant au moins 2 h, avantageusement jusqu'à 3 h (dans les conditions acides de l'estomac et basiques de l'intestin). L'homme du métier connaît de tels systèmes

15 tampon. On en précise, à titre nullement limitatif, la nature ci-après.

Les compositions de l'invention associent :

- au moins un principe actif protéinique sous forme libre (voir ci-dessus), généralement un tel principe actif (mais l'intervention conjuguée de plusieurs principes actifs de ce type (voire d'au moins un

20 principe actif de ce type et d'au moins un autre principe actif), en mélange ou séparément, n'est pas exclu du cadre de l'invention) ; et

- un système (système tampon) capable d'exercer un effet tampon dans la zone de pH énoncée ci-dessus.

L'exercice dudit effet tampon dans ladite zone de pH

25 ($4 < \text{pH} \leq 8$) est évidemment compatible avec la stabilité dudit au moins un principe actif protéinique (en tout état de cause avec la stabilité du(des) principe(s) actif(s) présent(s)).

Les compositions de l'invention sont tamponnées à un pH :

30 $4 < \text{pH} \leq 8$. Elles sont avantageusement tamponnées à un pH compris entre 4,5 et 7,5 ($4,5 \leq \text{pH} \leq 7,5$), très avantageusement tamponnées à un pH compris entre 5 et 7 ($5 \leq \text{pH} \leq 7$), voire à un pH supérieur à 5 et inférieur ou égal à 7 ($5 < \text{pH} \leq 7$). De façon particulièrement préférée, elles sont tamponnées à un pH de 6,5 ou voisin de 6,5 ($6,5 \pm 0,2$). Cette valeur est tout particulièrement préférée dans le contexte où la

35 composition de l'invention renferme de l'insuline.

Les compositions de l'invention renferment au moins un principe actif protéinique, qu'elles sont capables de protéger des enzymes digestives. On vient de mentionner, à titre de tel principe actif sensible aux enzymes digestives, l'insuline. L'invention a tout particulièrement été développée en référence à ce principe actif (voir les exemples et essais présentés plus avant dans le présent texte). L'homme du métier comprend toutefois aisément que son champ d'application est assurément plus large. Le mécanisme *a priori* en jeu (que les inventeurs proposent *a posteriori*) – protection lors du passage dans l'estomac (à un pH > 4, la pepsine n'est plus (ou quasiment plus) active) et inhibition (plus ou moins conséquente) des sécrétions pancréatiques dans la mesure où ce n'est plus un chyme acide qui se déverse dans le duodénum – convient pour protéger tous les principes actifs protéiniques des enzymes digestives.

Ainsi, les compositions de l'invention renferment-elles, avantageusement, au moins un principe actif protéinique (sous forme libre) choisi parmi l'insuline, ses analogues et dérivés (renferment-elles généralement avantageusement de l'insuline ou l'un de ses analogues ou dérivés à titre d'unique principe actif de ce type, voire à titre d'unique principe actif). L'homme du métier connaît les analogues de l'insuline tels, par exemple, l'insuline Lipro, l'insuline Aspart, l'insuline Glargine et l'insuline Detemir. Il connaît aussi les dérivés de l'insuline, tels ceux décrits dans la demande FR 2 123 524.

Ainsi, les compositions de l'invention renferment-elles, avantageusement, à titre de principe actif (sous forme libre) :

- l'insuline, l'un de ses analogues ou dérivés,
- la somatotropine (hormone de croissance humaine) ou l'un de ses dérivés,
- la calcitonine, ou
- un analogue de la L.H.R.H. ("Luteinising Hormone Releasing Hormone"), tel que la tryptoréline.

On rappelle que les compositions de l'invention sont susceptibles de renfermer plusieurs de ces principes actifs et que la liste ci-dessus, loin d'être exhaustive, n'est en aucune façon limitative.

Les systèmes tampons convenant aux fins de l'invention sont des systèmes tampons classiques, avantageusement de forte capacité. L'homme du métier connaît de tels systèmes et est à même d'optimiser

une association au sens de l'invention : au moins un principe actif protéinique (sous forme libre)/système tampon (par exemple : insuline/système tampon).

De façon nullement limitative, on peut indiquer que le système responsable de l'effet tampon au sein des compositions de l'invention est
5 avantageusement un tampon choisi parmi les tampons phosphate, acétate, maléate, phtalate, succinate, citrate, imidazole, tétrabutylammonium, 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol (ou trihydroxyméthylaminométhane ou Trométamol ou Tham ou Tris),
10 tris-glycine, barbitol, tris-EDTA BSA, sulfate de cuivre et zwitterionique.

De manière plus générale, le système tampon des compositions de l'invention peut être choisi parmi la liste des systèmes tampons donnée dans la Pharmacopée Européenne, édition en cours (monographie 4.1.3).

Ledit système tampon est avantageusement un tampon
15 phosphate ou du Tris.

A titre de tampon phosphate, on préconise un tampon phosphate qui renferme :

de 2 à 3 % en masse de phosphate monosodique dihydrogéné,
et

20 de 97 à 98 % en masse de phosphate disodique monohydrogéné

qui renferme avantageusement :

environ 2,8 % en masse de phosphate monosodique dihydrogéné, et

25 environ 97,2 % en masse de phosphate disodique monohydrogéné.

Les compositions orales de l'invention (associant de façon originale au moins un principe actif protéinique, sous forme libre, et le système tampon sélectionné : $4 < \text{pH} \leq 8$) peuvent exister selon deux
30 variantes.

Selon une première variante, plus classique, elles sont formulées sous forme unitaire. Tous les ingrédients constitutifs, y compris le système tampon, sont formulés ensemble. Dans le cadre de cette première variante, de nombreuses possibilités existent. Les compositions
35 de l'invention peuvent notamment se présenter sous des formes liquides (directement tamponnées à un pH adéquat) telles des solutés, des

suspensions et des sirops ou sous des formes solides (qui développent l'effet tampon, lors de leur prise, dans un liquide, généralement de l'eau, ou suite à leur prise, dans l'estomac) telles des comprimés (classiques (à avaler), à sucer, sublinguaux, dispersibles, orodispersibles, effervescents),
5 des gélules, des poudres, des poudres effervescentes, des granulés, des granulés effervescents et des lyophilisats. Ces listes ne sont pas exhaustives. Le galéniste sait formuler, sous l'une ou l'autre des formes unitaires listées ci-dessus, le principe actif en cause avec un système adéquat, responsable de l'effet tampon recherché.

10 Dans la préparation de formes galéniques effervescentes, il convient d'ajouter les ingrédients aptes à conférer le caractère effervescent escompté. Ce type d'ingrédients (des réactifs (généralement deux réactifs) susceptibles de réagir en dégageant du gaz) est familier à l'homme du métier.

15 Dans le cadre de cette première variante, les compositions de l'invention se présentent avantageusement sous la forme de préparations galéniques solides, notamment de comprimés dispersibles ou de comprimés effervescents.

20 Selon une seconde variante, les compositions de l'invention sont des compositions à au moins deux composants séparés, notamment des compositions qui comprennent séparément :

- un composant renfermant le au moins un principe actif protéinique sous forme libre ; et
- un autre composant renfermant au moins le système
25 générateur de l'effet tampon désiré.

Ces deux composants, séparés, sont à administrer conjointement ou quasi conjointement, de sorte, bien évidemment, que l'effet tampon se développe lors du passage du principe actif dans les voies digestives (tout d'abord l'estomac).

30 Les compositions de l'invention (selon la première ou la seconde des variantes ci-dessus) qui renferment ledit au moins un principe actif protéinique sous forme libre (voire ledit au moins un principe actif protéinique sous forme libre et au moins un autre principe actif) et le système tampon associé, généralement dans un excipient
35 pharmaceutiquement acceptable (avec, si nécessaire, les ingrédients aptes à les rendre effervescentes), sont bien évidemment susceptibles de

renfermer d'autres ingrédients, intervenant de façon classique en galénique, du type édulcorant, arôme et/ou auxiliaires de fabrication (lubrifiant...)... Les compositions liquides peuvent ne renfermer que ledit au moins un principe actif protéinique (voire ledit au moins un principe actif protéinique sous forme libre et au moins un autre principe actif) et le système tampon adéquat. Elles renferment généralement, en sus de ces deux composants, des ingrédients de formulation classiquement utilisés en galénique (type ingrédients listés ci-dessus). Les compositions solides renferment généralement, en sus dudit au moins un principe actif protéinique (voire en sus dudit au moins un principe actif protéinique sous forme libre et d'au moins un autre principe actif) et du système tampon, un excipient solide (base, avec éventuellement des ingrédients responsables d'effervescence)) avec divers additifs (type ingrédients listés ci-dessus).

La préparation des compositions de l'invention, unitaires ou non, telles que décrites ci-dessus, constitue le second objet de l'invention présentement revendiquée. Ladite préparation est une préparation de forme galénique tamponnée ou associée à un tampon. De façon caractéristique, elle comprend la (simple) formulation d'au moins un principe actif protéinique sous forme libre, avec un système (système tampon) capable de tamponner ladite composition sous forme liquide (notamment en milieu gastrique et en milieu intestinal) à un pH supérieur à 4 et inférieur ou égal à 8 ou sous forme solide, avec un système (système tampon) susceptible d'exercer, lors de la mise en milieu liquide, notamment aqueux, de ladite forme solide (notamment en milieu gastrique et en milieu intestinal), un effet tampon entre un pH supérieur à 4 et un pH inférieur ou égal à 8. Le terme formulation est à prendre au sens classique du terme (en galénique) pour la préparation de compositions unitaires, au sens plus large (formulation = conditionnement) pour la préparation de compositions à composants séparés.

De façon classique, d'autres ingrédients sont susceptibles d'intervenir dans la préparation des compositions de l'invention.

L'homme du métier a saisi tout l'intérêt de la présente invention, confirmé par les exemples et résultats de tests présentés ci-après. Le "double effet positif" du tampon – gastro-protection et inhibition des

sécrétions pancréatiques – est particulièrement efficace. Ce double effet et son efficacité sont réellement surprenants.

Selon un autre de ses aspects, l'invention offre un débouché original à des systèmes tampons et concerne donc aussi l'utilisation d'un système tampon tel que précisé ci-dessus, notamment choisi parmi ceux identifiés ci-dessus, pour la protection d'au moins un principe actif protéinique sous forme libre, lors de son transit *via* le tractus gastro-intestinal. En d'autres termes, l'invention propose une méthode de protection originale, vis-à-vis des enzymes digestives (lors du transit gastro-intestinal), des principes actifs protéiniques. Ladite méthode comprend essentiellement la formulation, sous forme unitaire ou non, desdits principes actifs sous forme libre, avec un système tampon, tel que précisé ci-dessus, notamment choisi parmi ceux identifiés ci-dessus.

L'invention peut enfin s'analyser comme une méthode de traitement thérapeutique comprenant l'administration par voie orale d'au moins un principe actif protéinique et/ou une méthode d'administration par voie orale d'au moins un tel principe actif. De façon caractéristique, dans le cadre de ladite méthode, ledit au moins un principe actif est administré (formulé dans une composition solide ou liquide, unitaire ou non), sous forme libre, avec un système tampon tel que précisé ci-dessus ; c'est-à-dire tamponné à un pH tel que précisé ci-dessus : $4 < \text{pH} \leq 8$ (dans le cas d'une forme liquide) ou susceptible d'être tamponné, lors de sa mise en milieu liquide, à un tel pH (dans le cas d'une forme solide). Les thérapies concernées, connues à ce jour, sont celles des maladies ci-après : le diabète (en référence à l'administration d'insuline), l'inhibition de la croissance (en référence à l'administration de la somatotropine), l'ostéoporose (en référence à l'administration de la calcitonine), le cancer de la prostate (en référence à l'administration des analogues de la L.H.R.H.)...

On se propose maintenant d'illustrer l'invention en précisant, à titre purement illustratif, la formule de deux comprimés d'insuline tamponnée selon l'invention ; et

de démontrer le grand intérêt de ladite invention en présentant ci-après des résultats comparatifs de tests physico-chimiques réalisés *in vitro* et de tests pharmacologiques réalisés *in vivo* avec l'insuline.

I Formules

5 On a préparé, de façon connue *per se* (procédé de formulation classique), à partir des ingrédients indiqués, pris dans les quantités indiquées, deux types de comprimés de l'invention :

- des comprimés A dispersibles ; et
- des comprimés B effervescents

Comprimés A :

insuline humaine	:	3,5 mg (100 U)
trométamol (TRIS)	:	100 mg
calcium phosphate (dicalcique)	:	250 mg
cellulose microcristalline	:	250 mg
mannitol	:	250 mg
stéarate de magnésium	:	10 mg
silice colloïdale	:	1 mg
crospovidon	:	50 mg
sodium benzoate	:	30 mg
talc	:	10 mg
acide citrique	}	q.s.p. pH 6,5
citrate monosodique		

pois du comprimé : 1 gramme

10

Comprimés B :

insuline humaine	:	3,5 mg (100 U)
sodium citrate monosodique anhydre	:	1142,7 mg
sodium bicarbonate anhydre	:	2076 mg
sodium benzoate	:	152,60 mg
phosphate monosodique	:	120 mg
éthanol 96 %	}	q.s. pour granulation
eau déminéralisée		

pour un comprimé de masse théorique : 3,5 g
 en solution pH : 6,8.

II Tests in vitro

Des essais ont été réalisés *in vitro* pour confirmer le rôle
 5 métabolique de la pepsine en milieu acide, le rôle métabolique de la
 trypsine en milieu basique et l'inactivation de l'une et l'autre de ces
 enzymes digestives en milieu tamponné selon l'invention.

Au cours de ces différents essais, l'insuline a été dosée par
 chromatographie liquide.

10

Essai 1'

Solution d'insuline humaine (100 U)

+ HCl 0,1 N (50 ml) pH 1

+ agitation à 37°C 1 h/2 h/3 h

15

Temps	Teneur en insuline
Temps 0	99,00 U
1 h	99,87 U
2 h	100,13 U
3 h	100,30 U

En milieu acide, à pH 1, sans pepsine, l'insuline est stable
 pendant plus de 3 h à 37°C.

20

Essai 2'

Solution d'insuline humaine (100 U)

+ HCl 0,1 N (50 ml) pH 1

+ pepsine (160 mg)

25

+ agitation à 37°C 1 h

Temps	Teneur en insuline
Temps 0	0 U
1 h	0 U

En présence de l'enzyme gastrique (la pepsine), à pH 1, l'insuline est immédiatement dégradée.

5

Essai 1 (invention)

Solution d'insuline humaine (100 U)

+ HCl 0,1 N (50 ml) pH 1

+ pepsine (160 mg)

10 + tampon phosphate pH 6,8 (50 ml)

+ agitation à 37°C 1 h/2 h/3 h

Temps	Teneur en insuline
Temps 0	101,32 U
1 h	101,73 U
2 h	99,72 U
3 h	101,60 U

15 En milieu tamponné à pH 6,8, la pepsine n'est plus activée et l'insuline est stable pendant plus de 3 h à 37°C.

Essai 3'

Solution d'insuline humaine (100 U)

20 + HCl 0,1 N

+ tampon phosphate pH 8,5

+ agitation à 37°C 1 h/2 h/3 h

Temps	Teneur en insuline
Temps 0	100 U
1 h	99,59 U
2 h	100,24 U
3 h	100,48 U

On a vérifié au cours de cet essai l'efficacité du tampon et le fait, qu'en absence d'enzyme, l'insuline est stable en milieu basique.

5 Essais 2a, 2b, 2c (invention)

Solution d'insuline humaine (100 U)

+ tampon phosphate pH 6 (essai 2a) pH 6,5 (essai 2b)
pH 6,8 (essai 2c)

+ trypsine 750 U

10 + agitation à 37°C 1 h/2 h

Temps	Teneur en insuline		
	pH 6	pH 6,5	pH 6,8
Temps 0	100 U	100 U	98 U
1 h	92 U	83 U	56 U
2 h	86 U	72 U	48 U

En milieu tamponné aux pHs indiqués, l'effet métabolique de la trypsine est en grande partie atténué.

15

Essai 4'

Solution d'insuline humaine (100 U)

+ tampon phosphate pH 8,5

+trypsine 750 U

20 + agitation à 37°C 1 h/2 h

Temps	Teneur en insuline
Temps 0	89 U
1 h	14,5 U
2 h	1,5 U

En présence de l'enzyme intestinale (la trypsine), à pH 8,5, l'insuline est fortement dégradée.

5 L'examen de ces résultats (à pHs basiques) montre que plus le pH augmente vers l'alcalinité, plus la trypsine exerce son effet métabolique.

Le point optimum semble être le pH 6,5 (proche de la neutralité) où 2 h après, malgré la présence de trypsine, on retrouve un pourcentage d'insuline important : 72 %.

10

III Tests *in vivo*

15 L'activité hypoglycémiante de deux types de comprimés effervescents (avec système tampon de l'invention : comprimés B (voir ci-dessus) et sans système tampon de l'invention : comprimés effervescents témoins (du type des comprimés B mais sans tampon)) a été étudiée chez le rat rendu diabétique (hyperglycémique) par administration de streptozotocine.

20 La streptozotocine, antibiotique chimiquement apparenté aux nitro-urées, possède des propriétés diabétogènes par destruction des îlots de Langherans du pancréas.

Le test est tout à fait familier à l'homme de métier. Son principe est résumé ci-après.

25 L'administration par voie intrapéritonéale de 70 mg/kg de streptozotocine mise en solution dans le tampon citrate, à des rats mâles, de souche Wistar, d'un poids moyen de 200 g, provoque chez l'animal, au bout de 72 h, une hyperglycémie sévère, associée à une polyphagie, polydipsie et polyurie.

Les animaux sont répartis en trois lots de huit.

30

Lot 1 : animaux normaux, non hyperglycémiques, recevant par voie orale à l'aide d'une sonde œsophagienne, 30 unités d'insuline contenues dans un comprimé tamponné à pH 6,8 (comprimé effervescent B (voir ci-dessus)), sous un volume de 10 ml/kg.

35

Lot 2 : animaux diabétiques, recevant par voie orale à l'aide d'une sonde œsophagienne, 30 unités d'insuline contenues dans un comprimé non tamponné (comprimé effervescent du type des comprimés B mais sans tampon), sous un volume de 10 ml/kg.

5

Lot 3 : animaux diabétiques, recevant par voie orale à l'aide d'une sonde œsophagienne, 30 unités d'insuline contenues dans un comprimé tamponné à pH 6,8 (comprimé effervescent B (voir ci-dessus)), sous un volume de 10 ml/kg.

10

Les prises de sang sont effectuées toutes les 15 min pendant 3 h à la queue de l'animal et la glycémie est évaluée à l'aide d'un glucomètre Abbot.

15 Les résultats sont exprimés dans les tableaux ci-après. Ils sont exprimés en gramme de glucose par litre et également en milliéquivalent (tableau 1), et en pourcentage de diminution de la glycémie (tableau 2).

Temps en mn		0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180
Lot 1	g/l	0,99 ± 0,04	0,99 ± 0,03	0,98 ± 0,05	0,90 ± 0,03	0,85 ± 0,04	0,82 ± 0,05	0,82 ± 0,06	0,84 ± 0,06	0,91 ± 0,05	0,95 ± 0,04	0,99 ± 0,03	1,01 ± 0,02	0,99 ± 0,03
	mmeq /l	5,50 ± 0,2	5,50 ± 0,16	5,45 ± 0,3	5	4,72 ± 0,2	4,56 ± 0,3	4,56	4,7	4,7	5	5,3	5,50	5,6
Lot 2	g/l	3,94 ± 0,18	3,92 ± 0,16	3,91 ± 0,16	3,88 ± 0,15	3,84 ± 0,16	3,81 ± 0,14	3,82 ± 0,15	3,87 ± 0,13	3,91 ± 0,14	3,94 ± 0,15	3,95 ± 0,15	3,95 ± 0,16	3,92 ± 0,17
	mmeq /l	22 ± 1	21,7 ± 0,9	21,7 ± 0,9	21,6 ± 0,8	21,3 ± 0,9	21,2 ± 0,8	21,2 ± 0,8	21,2 ± 0,8	21,5 ± 0,7	21,7 ± 0,8	21,9 ± 0,8	21,9 ± 0,8	21,9 ± 0,9
Lot 3	g/l	3,8 ± 0,5	3,7 ± 0,5	3,2 ± 0,4	2,5 ± 0,3	2,5 ± 0,4	1,76 ± 0,3	1,64 ± 0,4	1,6 ± 0,4	1,65 ± 0,5	1,8 ± 0,5	2,3 ± 0,6	2,78 ± 0,8	3,4 ± 0,8
	mmeq /l	21,1 ± 2,8	20,6 ± 2,8	17,8 ± 2,2	14 ± 1,7	11,4 ± 2,2	9,8 ± 1,7	9,1 ± 2,2	8,9 ± 2,2	8,9 ± 2,2	9,2 ± 2,8	10 ± 2,8	12,8 ± 3,3	15,4 ± 4,5

Tableau 1: Glycémie (g/l et meq/l)

Temps en mn	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180
Lot 1	0	1	9	14	17	17	15	8	4	0	0	0
Lot 2	0,50	0,75	1,5	2,5	3,3	3	1,8	0,75	0,50	0	0	0
Lot 3	1	16	33	46	54	56	57	57	52	39	27	11

Tableau 2: % de diminution de la glycémie

Les résultats du tableau 2 ont été portés sur l'unique figure annexée (pourcentage de diminution de la glycémie en fonction du temps (exprimé en minute)):

- 5
- la courbe —■— montre les résultats du lot 1,
 - la courbe --◆-- montre les résultats du lot 2,
 - la courbe —▲— montre les résultats du lot 3.

L'examen des résultats montre :

10 - chez l'animal normal (non hyperglycémique) (lot 1), l'administration d'insuline tamponnée entraîne dès 45 min une légère diminution de la glycémie dont le maximum se situe à la 75^{ème} minute, puis la glycémie retrouve des valeurs normales dès la 150^{ème} minute. Ces animaux, à pancréas intact, compensent par sécrétion de glucagon qui est hyperglycémiant ;

15 - chez l'animal diabétique (lot 2), l'administration d'insuline non tamponnée entraîne une très légère diminution de la glycémie non significative. Durant toute l'expérimentation, les animaux conservent une glycémie très élevée ;

20 - chez l'animal diabétique (lot 3), l'administration d'insuline tamponnée entraîne dès 45 min une diminution hautement significative de la glycémie dont le maximum se situe à la 105^{ème} minute, puis on observe une remontée progressive de la glycémie. Tous les animaux sont fortement corrigés, bien qu'ils ne retrouvent pas une glycémie normale, due à la sévérité du diabète.

25 Ces résultats montrent que le système tampon utilisé a permis de conserver l'activité hypoglycémiante de l'insuline administrée par voie orale (ce qui est tout à fait compatible avec les résultats obtenus *in vitro*) et confirment une bonne biodisponibilité de ladite insuline.

30 Les résultats, tant *in vitro* que *in vivo*, démontrent l'efficacité du système tampon pour préserver l'activité de l'insuline :

- *in vitro*, en milieu acide, non tamponné, l'insuline est métabolisée par la pepsine (essai 2'). En milieu tamponné à pH 6,8, la pepsine n'est plus active et on retrouve de ce fait 100 % d'insuline à l'issue de 3 h (essai 1),

en milieu basique, l'insuline est métabolisée par la trypsine (essai 4'). En milieux tamponnés à pH 6, 6,5 et 6,8, l'activité de ladite trypsine est inhibée, plus ou moins diminuée ;

- 5 - *in vivo*, la préparation non tamponnée ne présente pratiquement pas d'activité. La préparation tamponnée présente par contre une importante activité hypoglycémiante.

10 Dans tous les essais, tant *in vitro* que *in vivo*, l'insuline humaine a été employée. Il est évident que les résultats obtenus sont transposables à tous les analogues de l'insuline.

15 A la considération de ces résultats, on ne manque pas de saisir tout l'intérêt de la présente invention. Cet intérêt a été confirmé par des essais préliminaires chez l'homme.

REVENDICATIONS

1. Composition, sous forme liquide ou solide, renfermant :
au moins un principe actif protéinique sous forme libre, ainsi que,
5 liquide, un système capable de la tamponner à un pH supérieur à 4 et
inférieur ou égal à 8 ou, solide, un système susceptible d'exercer, lors de
sa mise en milieu liquide, un effet tampon entre un pH supérieur à 4 et un
pH inférieur ou égal à 8,
pour utilisation comme médicament, pour administration par voie orale
10 dudit au moins un principe actif protéinique.

2. Composition pharmaceutique, sous forme liquide ou solide,
pour administration par voie orale, renfermant au moins un principe actif
protéinique, caractérisée en ce qu'elle renferme ledit au moins un principe
actif protéinique, sous forme libre, ainsi que, liquide, un système capable
15 de la tamponner à un pH supérieur à 4 et inférieur ou égal à 8, ou, solide,
un système susceptible d'exercer, lors de sa mise en milieu liquide, un
effet tampon entre un pH supérieur à 4 et un pH inférieur ou égal à 8.

3. Composition selon la revendication 1 ou 2, susceptible d'être
obtenue par formulation, dudit au moins un principe actif protéinique sous
20 forme libre, avec un système capable de la tamponner, sous forme liquide,
à un pH supérieur à 4 et inférieur ou égal à 8 ou, sous forme solide, avec
un système susceptible d'exercer, lors de la mise en milieu liquide de
ladite forme solide, un effet tampon entre un pH supérieur à 4 et un pH
inférieur ou égal à 8.

25 4. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3,
caractérisée en ce que le pH tampon est compris entre 4,5 et 7,5, très
avantageusement entre 5 et 7.

5. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4,
caractérisée en ce que ledit au moins un principe actif protéinique est
30 choisi parmi :

- l'insuline, ses analogues et dérivés,
- la somatotropine et ses dérivés,
- la calcitonine, et
- les analogues de la L.H.R.H.

6. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ledit au moins un principe actif protéinique est choisi parmi l'insuline, ses analogues et dérivés.

5 7. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que ledit système, responsable de l'effet tampon, est un tampon choisi parmi les tampons phosphate, acétate, maléate, phtalate, succinate, citrate, imidazole, tétrabutylammonium, trihydroxyméthylaminométhane, tris-glycine, barbitol, tris-EDTA BSA, sulfate de cuivre et zwitterionique.

10 8. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elle est formulée sous forme unitaire.

15 9. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle se présente, liquide, sous la forme d'un soluté, d'une suspension ou d'un sirop ou, solide, sous la forme de comprimés, notamment dispersibles, orodispersibles, effervescents, de gélules, d'une poudre, d'une poudre effervescente, de granulés, de granulés effervescents ou d'un lyophilisat.

20 10. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'elle se présente sous la forme de préparations galéniques solides, notamment de comprimés dispersibles ou de comprimés effervescents.

11. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que ledit système responsable de l'effet tampon est formulé séparément dudit au moins un principe actif protéinique.

25 12. Procédé de préparation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend la formulation dudit au moins un principe actif protéinique sous forme libre, avec un système capable de tamponner ladite composition, sous forme liquide, à un pH supérieur à 4 et inférieur ou égal à 8, ou sous forme
30 solide, avec un système susceptible d'exercer, lors de la mise en milieu liquide de ladite forme solide, un effet tampon entre un pH supérieur à 4 et un pH inférieur ou égal à 8.

13. Composition pharmaceutique, sous forme liquide ou solide, renfermant :

- 5 - au moins un principe actif protéinique choisi parmi l'insuline, ses analogues et dérivés, sous forme libre ; ainsi que
- liquide, un système capable de la tamponner à un pH compris entre 5 et 7 ou, solide, un système susceptible d'exercer, lors de sa mise en milieu liquide, un effet tampon à un pH compris entre 5 et 7.

10 14. Composition selon la revendication 13, caractérisée en ce que ledit système, responsable de l'effet tampon, est un tampon choisi parmi les tampons phosphate, acétate, maléate, phtalate, succinate, citrate, imidazole, tétrabutylammonium, trihydroxyméthylaminométhane, tris-glycine, barbitol, tris-EDTA BSA, sulfate de cuivre et zwitterionique.

15 15. Composition selon la revendication 13 ou 14, caractérisée en ce qu'elle est formulée sous forme unitaire.

20 16. Composition selon l'une quelconque des revendications 13 à 15, caractérisée en ce qu'elle se présente, liquide, sous la forme d'un soluté, d'une suspension ou d'un sirop ou, solide, sous la forme de comprimés, notamment dispersibles, orodispersibles, effervescents, de gélules, d'une poudre, d'une poudre effervescente, de granulés, de granulés effervescents ou d'un lyophilisat.

25 17. Composition selon l'une quelconque des revendications 13 à 16, caractérisée en ce qu'elle se présente sous la forme de préparations galéniques solides, notamment de comprimés dispersibles ou de comprimés effervescents.

30 18. Composition selon la revendication 13 ou 14, caractérisée en ce que ledit système responsable de l'effet tampon est formulé séparément dudit au moins un principe actif protéinique.

35 19. Composition selon l'une quelconque des revendications 13 à 18 pour son utilisation dans le traitement par voie orale du diabète.

20. Utilisation d'un système tampon pour la fabrication d'une composition pharmaceutique destinée au traitement du diabète par voie orale ; ladite composition pharmaceutique, liquide ou solide, renfermant au moins un principe actif protéinique choisi parmi l'insuline, ses analogues et dérivés, sous forme libre ainsi que ledit système tampon ;
5 ledit système tampon convenant pour tamponner ladite composition pharmaceutique, liquide, à un pH compris entre 5 et 7 ou étant susceptible d'exercer, lors de la mise en milieu liquide de ladite composition pharmaceutique solide, un effet tampon à un pH compris
10 entre 5 et 7.

21. Utilisation d'un système tampon pour la fabrication d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie par voie orale ; ladite composition pharmaceutique, liquide ou solide,
15 renfermant au moins un principe actif protéinique sous forme libre ainsi que ledit système tampon ; ledit système tampon convenant pour tamponner ladite composition pharmaceutique, liquide, à un pH supérieur à 4 et inférieur ou égal à 8 ou étant susceptible d'exercer, lors de la mise en milieu liquide de ladite composition pharmaceutique solide, un effet
20 tampon entre un pH supérieur à 4 et inférieur ou égal à 8.

