



(12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 34633 B1**
- (51) Cl. internationale : **A61K 31/616; A61P 13/04; A61P 13/12**
- (43) Date de publication : **02.11.2013**
-
- (21) N° Dépôt : **34764**
- (22) Date de Dépôt : **12.04.2012**
- (71) Demandeur(s) : **UNIVERSITÉ MOHAMMED V SOUISSI, Angle avenue Allal El Fassi et Mfadel Cherkaoui Al Irfane 8007. N.U RABAT (MA)**
- (72) Inventeur(s) : **Bouatia Moustapha ; Draoui Mustapha ; Oulad Bouyahy Idrissi Mohamed**
- (74) Mandataire : **Zaoui Fatima**
-
- (54) Titre : **une nouvelle application de l'acide acétylsalicylique (AAS) ou ses dérivés dans le traitement et la prévention des lithiases d'origine calcique**
- (57) Abrégé : **UNE NOUVELLE APPLICATION DE L'ACIDE ACÉTYLSALICYLIQUE (AAS) OU SES DÉRIVÉS DANS LE TRAITEMENT ET LA PRÉVENTION DES LITHIASES D'ORIGINE CALCIQUE. LA NOUVELLE APPLICATION PERMET DE CONSTATER L'EFFET TOPIQUE DES INHIBITEURS DE LA CALCIFICATION : L'AAS (OU SES DÉRIVÉS) JOUE UN RÔLE INHIBITEUR IMPORTANT DANS LA FORMATION ET LA CRISTALLISATION DES CALCULS OXALO-CALCIQUES. L'OXALATE DE CALCIUM EST LE CONSTITUANT PRINCIPAL DE LA LITHIASÉ URINAIRE ET REPRÉSENTE PLUS DE 70% DES CAS. AFIN D'OPTIMISER LES RÉSULTATS, UN MODÈLE EXPÉRIMENTAL A ÉTÉ DÉVELOPPÉ. LA CRISTALLISATION DE CAC2O4 AVEC ET SANS INHIBITEURS, À DES CONCENTRATIONS PHYSIOLOGIQUES, A ÉTÉ ÉTUDIÉE PAR TURBIDIMÉTRIE À TEMPÉRATURE AMBIANTE. L'EFFET D'INHIBITION A ÉTÉ ÉVALUÉ PAR LE TEMPS D'INDUCTION (NUCLÉATION) ET LA PENTE TURBIDIMÉTRIQUE (CROISSANCE CRISTALLINE). NOTRE INVENTION CONCERNE L'EFFET DE L'ACIDE ACÉTYLSALICYLIQUE (OU ASPIRINE), SUR LES CALCULS CAOX DÉJÀ UTILISÉ EN THÉRAPEUTIQUE DEPUIS PLUSIEURS DÉCENNIES, EN UTILISANT LA TECHNIQUE TURBIDIMÉTRIQUE. CETTE INVENTION PERMIS D'INTRODUIRE DANS LE DOMAINE DES LITHIASES L'INHIBITEUR "ASPIRINE". NOUS AVONS SURTOUT PORTÉ NOTRE EFFORT SUR LES SYSTÈMES CALCIFIQUES (OXALATE OU PHOSPHATE). LA PREMIÈRE APPLICATION EST LA PRÉVENTION DES CALCULS URINAIRES.**

Résumé de l'invention

Une nouvelle application de l'acide acétylsalicylique (AAS) ou ses dérivés dans le traitement et la prévention des lithiases d'origine calcique.

La nouvelle application permet de constater l'effet topique des inhibiteurs de la calcification : l'AAS (ou ses dérivés) joue un rôle inhibiteur important dans la formation et la cristallisation des calculs oxalo-calciques. L'oxalate de calcium est le constituant principal de la lithiase urinaire et représente plus de 70% des cas.

Afin d'optimiser les résultats, un modèle expérimental a été développé. La cristallisation de CaC_2O_4 avec et sans inhibiteurs, à des concentrations physiologiques, a été étudiée par turbidimétrie à température ambiante. L'effet d'inhibition a été évalué par le temps d'induction (nucléation) et la pente turbidimétrique (croissance cristalline).

Notre invention concerne l'effet de l'acide acétylsalicylique (ou Aspirine), sur les calculs CaOx déjà utilisé en thérapeutique depuis plusieurs décennies, en utilisant la technique turbidimétrique.

Cette invention permis d'introduire dans le domaine des lithiases l'inhibiteur « aspirine ». Nous avons surtout porté notre effort sur les systèmes calciques (oxalate ou phosphate). La première application est la prévention des calculs urinaires.

34633
02 NOV 2013

La présente invention concerne la médecine, elle décrit une nouvelle application de l'acide acétylsalicylique en particulier l'Aspirine (AAS) ou ses dérivés dans le traitement et la prévention des lithiases d'origine calcique.

L'état de l'art :

Selon le VIDAL (La référence en matière d'information sur le médicament) L'acide acétylsalicylique a un effet antalgique, antipyrétique et anti-inflammatoire, anti agrégeant plaquettaire, mais aucune publication n'a été faite sur l'activité d'inhibition des calculs urinaires calciques ou non.

La lithiase est un problème majeur de santé publique. Le sujet lithiasique présente des formes graves avec des formes multiples récidivantes, telle une modification dans le fonctionnement des reins. Les traitements médicaux sont coûteux et pas toujours concluants.

La lithiase urinaire évolue selon le niveau socioéconomique et les modifications du mode de vie et des habitudes alimentaires des populations. elle touche 4-15% de la population dans le monde [Chauhan C. K., Joshi M. J., Vaidya A. D. B., (2008)]. En effet, des études épidémiologiques récentes confirment sa progression et montrent son caractère récidivant important, puisque la récurrence avoisine les 50% des cas [Chauhan C. K., Joshi M. J (2008)]. Ces données font de cette pathologie une affection sérieuse et coûteuse nécessitant des mesures de prévention capables de limiter sa progression et de diminuer la récurrence (L. A. Pinales,)

Les calculs d'oxalate de calcium (CaOx) sont les premiers constitutifs de plus de 80% de la majorité des calculs rénaux de l'homme; ils existent sous la forme Monohydraté et dihydraté (T. Knoll, 2010)

La formation de calculs d'oxalate de calcium est un processus multi-étapes elle comprend : la croissance des cristaux de nucléation, l'agrégation et la rétention de cristal. Ce processus nécessite l'urine sursaturée, il dépend de plusieurs facteurs : le pH urinaire, la force ionique, la concentration du soluté et ligands.

Avec les progrès substantiels dans la physiopathologie et le traitement de la lithiase urinaire, il n'existe pas de médicament satisfaisant à utiliser dans la thérapie clinique. La chirurgie, l'endoscopie et la lithotripsie extracorporelle sont d'un coût prohibitif et la récurrence est assez fréquente avec ces procédures [Prasad K 2007]. Ainsi, un médicament pour la prévention de cette maladie ou sa récurrence serait d'un grand intérêt.

Les études de cristallisation de l'oxalate de calcium (CaOx) ont un intérêt important pour les chercheurs et les urologues. L'utilisation clinique d'inhibiteurs pour prévenir la formation des calculs CaOx a été limitée à certains minéraux (sélénium, magnésium, etc), et substances naturelles (plantes), avec le risque de toxicité inattendu que peuvent induire ces substances.

Notre invention concerne l'effet de l'acide acétylsalicylique (ou Aspirine), sur les calculs CaOx en utilisant la technique turbidimétrique.

Description

Cette invention a permis d'introduire dans le domaine des lithiases l'inhibiteur « aspirine ». Nous avons surtout porté notre effort sur les systèmes calciques (oxalate ou phosphate). La première application est la prévention des calculs urinaires.

A concentration élevée l'aspirine diminue la nucléation, le t_{max} et l'agrégation des cristaux formés. Le taux d'inhibition de la cristallisation varie de manière logarithmique en augmentant le rapport des concentrations [Aspirine/Calcium], Fig.2 ($R^2 = 0,9900$). Cet effet est souvent lié à la Complexation du calcium par les fonctions carboxylique et phénolique porté sur la molécule de l'aspirine. Par ailleurs le taux d'inhibition de l'agrégation croît linéairement en augmentant la concentration de l'aspirine ou du rapport des concentrations [aspirine/calcium], Fig.2 ($R^2 = 0,9845$)

La cristallisation de l'oxalate de calcium monohydraté a été obtenue par mélange de 2 ml de chlorure de calcium dihydraté (5 mM) et 1 ml d'oxalate de sodium (10 mM), contenant 0,15mM de chlorure de sodium afin de maintenir la force ionique constante, ces solutions sont filtrées à travers un filtre de 0,22 μ m.

Tous les produits chimiques utilisés sont des produits Riedel-de Haën de pureté analytique. Pour cette étude les concentrations ont été choisies en raison de leur similitude avec les concentrations urinaires physiologiques. La valeur du pH a été ajustée à 5,7. Cette valeur de pH est fréquemment observée dans les premières urines du matin des patients à lithiases calciques [Berg C, Tiselius HG (1986)].

La densité optique a été mesurée à 620 nm en fonction de temps pendant 400 sec, en utilisant un spectrophotomètre UV Perkin Elmer piloté par ordinateur [Bensatal A., Ouahrani M. R., (2008)]. Dans la cuve, les solutions ont été constamment agitées à 500 rpm (en utilisant une tige d'agitation couverte de téflon) à température ambiante.

Au cours de la cristallisation, L'augmentation maximale de la densité optique en fonction du temps, appelée SN, reflète principalement le taux maximum de la formation de particules ceci correspond à la phase de nucléation. Le Temps maximum, à savoir t_{max} , correspond au temps entre l'addition d'oxalate et le moment où l'absorbance maximale (équilibre) est mesurable. Après l'atteinte de l'équilibre, les cristaux ne peuvent ni se nucléer, ni se développer. Ensuite une diminution progressive de la densité optique en fonction du temps est observée, la pente maximale de la diminution de la densité optique à 620 nm reflète la diminution du nombre de particules en raison de l'agrégation des cristaux. Sous l'effet de l'augmentation de l'agrégation du cristal, la densité optique continue à diminuer. Le taux d'agrégation (SA), est déterminé de la diminution de la densité maximale optique.

À la fin de chaque expérience, les cristaux ont été transférés de la cuve spectrophotométrique et observés par microscopie en lumière polarisée. Ils sont photographiés à un grossissement de 1000.

L'étude sans inhibiteur à 2 ml de la solution de CaCl_2 (5mM) transférée dans une cuve de 10mm de trajet optique, on ajoute un volume de 1 ml d'oxalate de sodium (10mM), et la mesure est immédiatement lancée. Les concentrations d'essai final sont (3,34mM) pour le calcium et pour l'oxalate,

Etude avec l'inhibiteur, à Quatre solutions de CaCl_2 (5mM) contiennent chacune l'Aspirine (Asp) comme inhibiteur à une gamme de concentrations croissantes de 1.25, 2.5, 5 et 7.5mM. On a procédé à l'essai comme précédemment et dans les mêmes conditions. Pour chaque concentration, l'expérience a été répétée six fois.

L'aspirine étudiée, est conforme aux spécifications de la pharmacopée européenne en vigueur.

Sur la plan statistiques Toutes les valeurs présentées sont des moyens \pm SD. Le test de Student apparié et l'ANOVA one way ont été utilisés pour les comparaisons entre les groupes. Pour les mesures de la pente, l'analyse de régression linéaire a été utilisée.

Le pourcentage d'inhibition est calculé par $[1 - (\text{SNa} / \text{SNc})] \times 100$ pour le taux de nucléation (TN), et $[1 - (\text{SAa} / \text{SAc})] \times 100$ pour le taux d'agrégation (TA), où (a) représente l'aspirine et (c) pour le contrôle. Une valeur de $P < 0,05$ a été considérée comme significative.

Les résultats : La mesure en cinétique de la densité optique à 620 nm dans des conditions standard (2 ml de calcium à 5 mM et 1 ml d'oxalate à 10 mM) est illustrée dans la Fig. 1. La quantité de cristaux formés augmente en fonction de temps jusqu'à ce qu'un maximum est atteint. Après l'atteinte de l'équilibre à 74 secondes, la densité optique diminue progressivement en raison de l'agrégation du cristal.

La reproductibilité des mesures avec ou sans inhibiteur, est bonne (coefficient de variation $[\text{CV}] < 6,6\%$), ce qui suggère que dans les mêmes conditions expérimentales, une répartition identique du nombre de particules et de la taille est reproductible.

L'effet inhibiteur de l'aspirine sur la nucléation des cristaux d'oxalate de calcium est indiqué dans le tableau 1 et Fig. 1. En présence de l'aspirine à une concentration au delà de 5mM, le t_{max} a augmenté et les pentes de la croissance des cristaux d'oxalate de calcium (SN et SA) ont diminué de manière dépendante de la concentration ($P < 0,001$). Par contre à une concentration inférieure à 2,5 mM l'aspirine agit seulement par inhibition de l'agrégation ($P = 0,002$), le t_{max} et la nucléation ne sont pas influencés. À la plus forte concentration de l'aspirine, le ratio inhibition de la nucléation était de 97,4% et le cristal d'agrégation a été inhibé approximativement par 81,57%, Tableau 2.

In vitro, les systèmes de cristallisation sont largement utilisés à des fins différentes en matière de recherche de lithiase urinaire. Depuis, la formation de calculs rénaux est un processus complexe qui résulte d'une succession de plusieurs phénomènes physico-chimiques [M. Daudon, (2008)] La sursaturation de l'urine serait le principal phénomène responsable de la formation des calculs d'oxalate de calcium [[M. Daudona, (2008)].

Lorsque la sursaturation urinaire en oxalate de calcium excède la limite de métastabilité, la nucléation de microcristaux se produit. Deux processus distincts régissent les calculs urinaires, à savoir la nucléation et l'agrégation des cristaux d'oxalate de calcium. La présente étude implique à la fois la nucléation et l'agrégation sur la formation des cristaux d'oxalate de calcium. Ce modèle in vitro utilisé pour simuler les conditions urinaires et intra-rénales est décrit par divers auteurs.

A faible concentration 2,5 mM, l'aspirine n'a pas pu modifier la métastabilité de l'oxalate de calcium, par comparaison du temps d'induction et tmax de contrôle. Par contre à une telle concentration, l'aspirine a montré un effet positif sur l'agrégation des cristaux formés par diminution de la pente d'agrégation.

A concentration élevée l'aspirine diminue la nucléation, le tmax et l'agrégation des cristaux formés. Le taux d'inhibition de la cristallisation varie de manière logarithmique en augmentant le rapport des concentrations [Aspirine/Calcium], Fig.2 ($R^2 = 0,9900$). Cet effet est souvent lié à la Complexation du calcium par les fonctions carboxylique et phénolique porté sur la molécule de l'aspirine. Par ailleurs le taux d'inhibition de l'agrégation croît linéairement en augmentant la concentration de l'aspirine ou du rapport des concentrations [aspirine/calcium], Fig.2 ($R^2 = 0,9845$). Comme pour les composés organiques, l'aspirine s'adsorbe à la surface du cristal inhibant ainsi la nucléation et l'agrégation des cristaux [Basavaraj D.R, (2007).]

L'aspirine constitue le traitement antalgique, antipyrétique et anti-inflammatoire le plus connu et le plus ancien. cependant, il peut constituer par L'interférence avec la croissance et l'agrégation des cristaux, une stratégie thérapeutique possible pour la prévention de la lithiase récurrente.

Comme la lysine a fait la preuve d'efficacité in vitro [S. Atanassova, (2000)], son association à l'aspirine dans des spécialités pharmaceutiques peuvent être un traitement prometteur dans la prévention des lithiases urinaires chez les sujets à risque

En conclusion : cette invention a permis d'introduire dans le domaine des lithiases l'inhibiteur « aspirine ». Nous avons surtout porté notre effort sur les systèmes calciques (oxalate ou phosphate). La première application est la prévention des calculs urinaires. Ces inhibiteurs sont ensuite expérimentés suivant un protocole complexe faisant l'objet d'autres travaux in vivo pour augmenter l'effet sur la cristallisation des calculs calciques.

Les revendications

1. Utilisation de l'Acide Acétylsalicylique ou ses dérivés comme médicament destiné à prévenir et ou traiter les lithiases d'origine calcique formées d'Oxalate et/ou de phosphate de calcium, par une complexation du calcium in vivo et in vitro,
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisé en ce que le médicament utilisé entant que nouveau procédé de complexation des calculs oxalo-calciques du pour diminuer l'effet de nucléation et d'agrégation des particules,
3. Utilisation selon la revendication 1 et 2, caractérisé en ce que le médicament est utilisé pour la prévention et le traitement des lithiases calciques formées par l'oxalate de calcium et le phosphate de calcium en particulier les lithiases rénales, lithiases biliaires,
4. Utilisation selon les revendication 1, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique est dosée de 5 à 10 mMol invitro et invivo, (équivalent en dose de 125 à 250 mg/jour),
5. Utilisation selon les revendications 1 caractérisée en ce que la composition pharmaceutique est administrée par voie orale,
6. Utilisation selon les revendications 1, 2, 3, 4 et 5 caractérisée en ce que l'action médicament est observée avec une utilisation sous forme pure ou avec des adjuvants.

	3,34mM calcium 3,34mM oxalate (controle)	3,34mM calcium 3,34mM oxalate 0,834mM asp	3,34mM calcium 3,34mM oxalate 1,66mM asp	3,34mM calcium 3,34mM oxalate 3,34mM asp	3,34mM calcium 3,34mM oxalate 5mM asp
Tmax sec	74 ± 7,48	74 ± 7,04 P = 0,890	94 ± 9,71 P = 0,004	130 ± 7,48 P < 0,001	184 ± 17,52 P < 0,001
SN (x10 ⁻³)	24,68± 1,11	24,33 ± 1,03 P = 0,568	17,1 ± 2,07 P < 0,001	5,4± 0,38 P = 0,001	0,64 ± 0,05 P < 0,001
SA (x10 ⁻³)	1,22 ±0,091	1,01 ±0,071 P = 0,007	0,84 ± 0,050 P < 0,001	0,44 ±0,04 P < 0,001	0,22 ±0,027 P < 0,001

Tableau 1 : Effet de l'aspirine sur la cristallisation de CaOx (La valeur P est calculée par rapport au contrôle)

Concentration d'asp en mM	1,25	2,5	5	7,5
Rapport [Asp/Ca]	0,25	0,50	1,00	1,50
% d'inhibition de nucléation (TN)	1,42	30,48	78,13	97,42
% d'inhibition d'agrégation (TA)	17,21	31,28	63,66	81,57

Tableau 2 : Taux d'inhibition de nucléation et d'agrégation de CaOx par l'aspirine

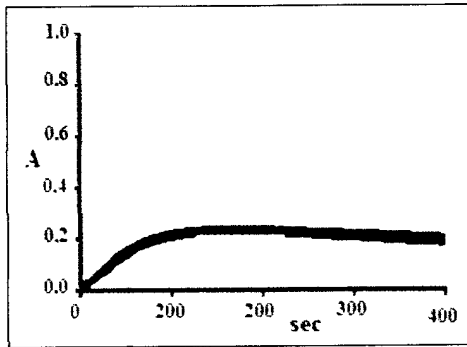


Figure 1-a : courbe turbidimétrique avec aspirine à 7,5mM

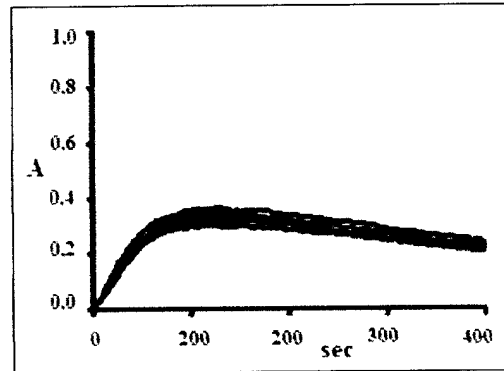


Figure 1- b : courbe turbidimétrique avec aspirine à 5mM

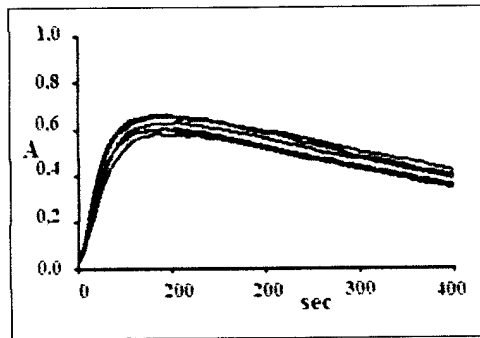


Figure 1-c : courbe turbidimétrique avec aspirine à 2,5mM

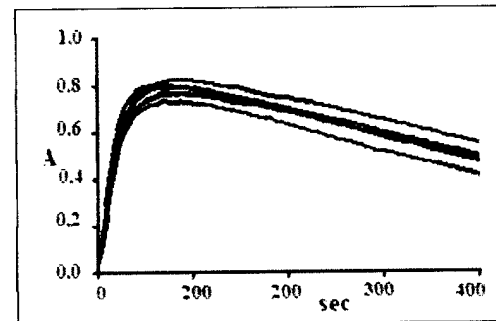


Figure 1-d : courbe turbidimétrique avec aspirine à 1,25mM

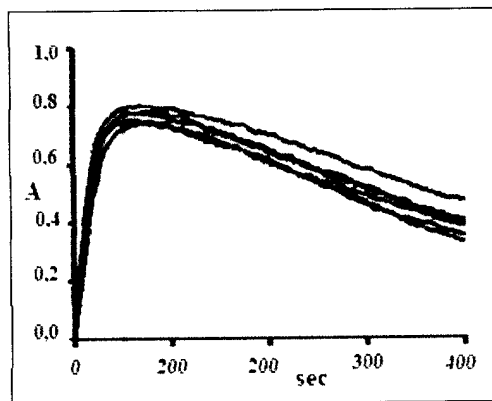


Figure 1-e : courbe turbidimétrique sans inhibiteur (contrôle)

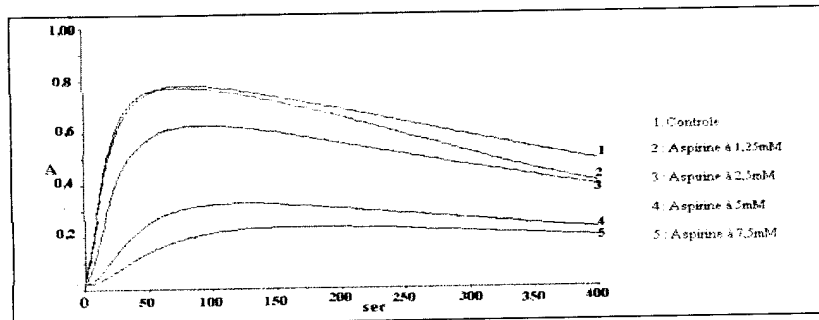


Figure 1-f: Spectres moyens représentant la modification de la turbidimétrie sans (contrôle) et avec aspirine à différentes concentrations

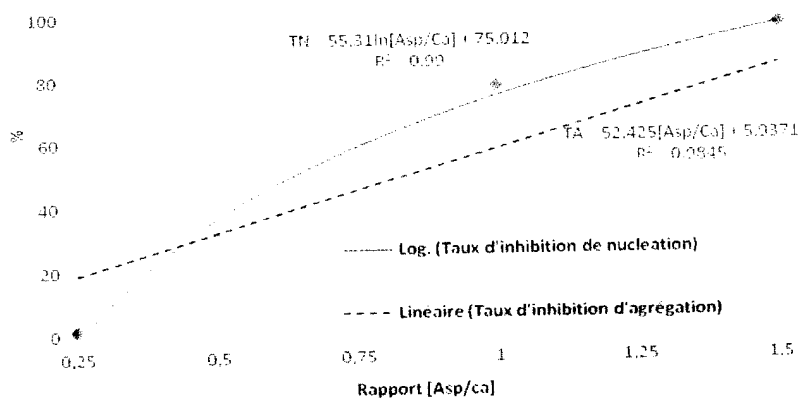


Figure 2 : Corrélation entre le taux d'inhibition et le rapport des concentrations [Asp/Ca]