

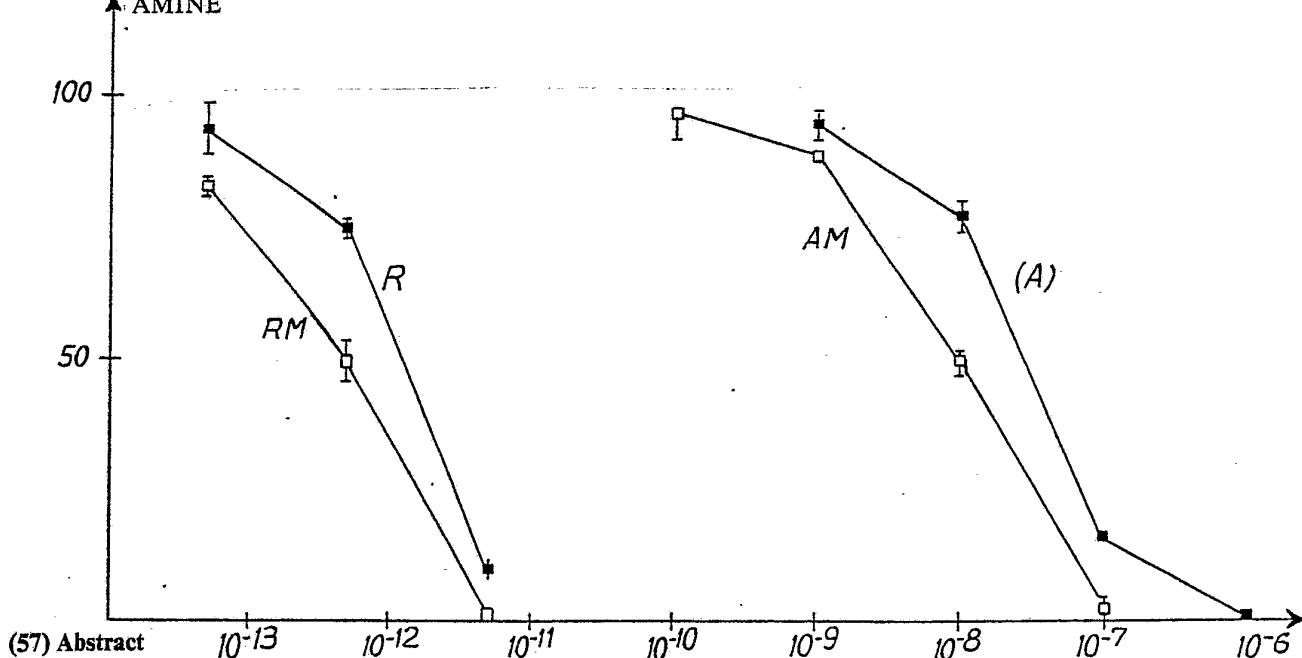


DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ³ : A61K 39/395		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 83/ 03200 (43) Date de publication internationale: 29 septembre 1983 (29.09.83)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR83/00043 (22) Date de dépôt international: 7 mars 1983 (07.03.83) (31) Numéro de la demande prioritaire: 82/04119 (32) Date de priorité: 11 mars 1982 (11.03.82) (33) Pays de priorité: FR		(81) Etats désignés: DK, JP, NO, US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): SANO-FI [FR/FR]; 40, avenue George V, F-75008 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): JANSEN, Franz [FR/FR]; Chemin des Sesquets, F-34160 Assas (FR). GROS, Pierre [FR/FR]; 18, rue des Muriers, F-34100 Montpellier (FR).		(74) Mandataire: COMBE, André; Cabinet Beau de Loménie, 55, rue d'Amsterdam, F-75008 Paris (FR).	

(54) Title: CYTOTOXIC MEDICINES INCLUDING AT LEAST AN IMMUNOTOXINE AND AN AMINE

(54) Titre: MEDICAMENTS CYTOTOXIQUES COMPORTANT AU MOINS UNE IMMUNOTOXINE ET UNE AMINE



The present invention relates to cytotoxic medicines characterized in that they contain in association at least an immunotoxine and an amine or a pharmaceutically acceptable salt of said amine.

(57) Abrégé

Médicaments cytotoxiques caractérisés en ce qu'ils contiennent en association au moins une immunotoxine et une amine ou un sel pharmaceutiquement acceptable de ladite amine.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

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

AT	Autriche	LI	Liechtenstein
AU	Australie	LK	Sri Lanka
BE	Belgique	LU	Luxembourg
BR	Brésil	MC	Monaco
CF	République Centrafricaine	MG	Madagascar
CG	Congo	MR	Mauritanie
CH	Suisse	MW	Malawi
CM	Cameroun	NL	Pays-Bas
DE	Allemagne, République fédérale d'	NO	Norvège
DK	Danemark	RO	Roumanie
FI	Finlande	SE	Suède
FR	France	SN	Sénégal
GA	Gabon	SU	Union soviétique
GB	Royaume-Uni	TD	Tchad
HU	Hongrie	TG	Togo
JP	Japon	US	Etats-Unis d'Amérique
KP	République populaire démocratique de Corée		

Médicaments cytotoxiques comportant au moins une immunotoxine et une amine.

La présente invention concerne des médicaments cytotoxiques comportant au moins une immunotoxine et une amine de formule R_1NHR_2 dans laquelle R_1 représente de l'hydrogène ou un groupe alkyle inférieur (ayant 1 à 4 atomes de carbone), R_2 représente un groupe alkyle inférieur ou encore l'ensemble R_1NHR_2 représente l'amino-1 adamantane.

Dans les demandes de brevets français antérieures, portant notamment les numéros 78 27 838, 79 24 655, 81 07 596 et 10 81 21 836, on a décrit la préparation de produits anticancéreux dits conjugués obtenus par couplage, par liaison covalente, de la chaîne A de la ricine avec des anticorps ou fragments d'anticorps dirigés contre un antigène porté par une cellule à détruire. Les produits 15 de ce type sont désignés dans la présente demande sous le nom générique d'immunotoxines.

Dans la demande française 81 21 836 on a décrit en outre la propriété des ions ammonium (sous la forme d'un quelconque de leurs sels et en particulier le chlorure) de potentialiser de 20 façon efficace l'action cytotoxique de ces immunotoxines.

Dans la demande de brevet français 82 02 091, du 9 février 1982, la demanderesse a décrit la propriété des substances appartenant à la classe des ionophores carboxyliques de potentiaiser l'activité des immunotoxines et d'accélérer leur cinétique 25 d'action.

La présente invention a pour objet la préparation de médicaments cytotoxiques puissants utilisant la potentialisation des effets cytotoxiques sélectifs des immunotoxines décrites dans les demandes de brevets antérieures; il a été trouvé en effet que les 30 amines définies ci-dessus utilisées sous la forme d'un de leurs sels pharmaceutiquement acceptables et à des doses où elles ne présentent elles-mêmes aucune cytotoxicité propre pour les lignées étudiées étaient des potentialisateurs extrêmement puissants et des accélérateurs de l'effet cytotoxique des immunotoxines.

Les exemples suivants non limitatifs permettent de mieux comprendre la portée de l'invention.



Exemple 1

5 Cet exemple démontre la potentialisation de la cytotoxicité sélective de l'immunotoxine anti-T65 (telle que décrite dans la demande n° 81 21 836 de la demanderesse) vis-à-vis des cellules lymphoblastoides T humaines de la lignée CEM portant l'antigène T65 par la méthylamine.

10 Dans ces expériences, la cytotoxicité a été évaluée par la mesure de l'incorporation de ^{14}C -leucine par les cellules après 18 h d'incubation à 37°C en présence de quantités connues de l'immunotoxine étudiée, ou de substances cytotoxiques de référence, en absence ou en présence de méthylamine.

1 - Potentialisation de l'effet cytotoxique par la méthylamine.

15 Les résultats de ces expériences sont présentés sous la forme de courbes dose/effet présentant en ordonnée l'effet cytotoxique évalué comme indiqué ci-dessus par l'incorporation du traceur, calculée en % de la valeur obtenue sur les cellules témoins sans substance cytotoxique et en abscisse les concentrations molaires en sous-unité toxique des substances cytotoxiques étudiées. La méthylamine a été testée à la concentration de 10 millimolaires. Il a été 20 préalablement vérifié que la méthylamine n'est pas spontanément cytotoxique pour les cellules employées à la concentration indiquée.

Sur la figure 1 on a représenté respectivement les résultats obtenus pour

- 25
- la chaîne A de la ricine (A)
 - la ricine (R)
 - la chaîne A de la ricine et la méthylamine (AM)
 - la ricine et la méthylamine (RM).

30 La figure 1 montre l'effet de la méthylamine sur la cytotoxicité propre de la ricine et de la chaîne A isolée, prises comme substances de référence. Les valeurs des concentrations molaires (CI50) correspondant à 50% d'inhibition d'incorporation du traceur sont indiquées dans le tableau I.

TABLEAU I

Substances testées	Avec méthylamine 10 mM	Sans méthylamine
Ricine	$5 \cdot 10^{-13} \text{ M}$	$1,2 \cdot 10^{-12} \text{ M}$
Chaîne A	$1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$	$2,6 \cdot 10^{-8} \text{ M}$



Ces résultats démontrent un très faible effet potentielisateur de la méthylamine sur la cytotoxicité de la ricine (facteur de potentialisation de 2,4) et de la chaîne A (facteur de potentialisation de 2,6).

Sur la figure 2 on a représenté respectivement les résultats obtenus pour :

- la chaîne A de la ricine (A)
- le conjugué anti-T65 (AT65),
- le conjugué anti-T65 en mélange avec l'ion ammonium (AT65-NH₄⁺),
- le conjugué anti-T65 en mélange avec la méthylamine (AT65-M)

La figure 2 montre l'effet potentialisateur comparé de l'ion NH₄⁺ (10 mM) et de la méthylamine (10 mM) sur la cytotoxicité de l'immunotoxine anti-T65 vis-à-vis des cellules de la lignée CEM. Les valeurs des concentrations molaires (CI50) correspondant à 50% d'inhibition d'incorporation du traceur sont rappelées dans le tableau II.

TABLEAU II

Substances potentialisatrices testées	CI50
Aucune	5.10 ⁻⁹ M
NH ₄ ⁺ 10 mM	3.10 ⁻¹³ M
Méthylamine 10 mM	1,5.10 ⁻¹³ M

Ces résultats montrent que l'effet potentialisateur de la méthylamine est voisin de celui de l'ion ammonium et de l'ordre d'un facteur de 13000. Ce facteur est considérablement plus élevé que ceux observés avec la ricine ou la chaîne A isolée. Ceci signifie qu'en présence de méthylamine l'immunotoxine anti-T65 est, vis-à-vis de sa cible spécifique, un agent cytotoxique près de 3 fois plus puissant que la ricine elle-même.

En outre, la méthylamine présente la propriété remarquable, non seulement de potentialiser l'activité, mais aussi d'augmenter la sélectivité de l'immunotoxine. Si l'on prend en effet comme critère de sélectivité d'action de l'immunotoxine le rapport



des CI50 de la chaîne A libre et de l'immunotoxine, ce rapport est de l'ordre de 5 en l'absence de méthylamine et voisin de 65000 en présence de méthylamine.

2 - Accélération des cinétiques de cytotoxicité par la méthylamine.

L'effet de la méthylamine ne se limite pas à accroître d'une façon considérable l'activité cytotoxique des immunotoxines. Cette substance permet aussi d'accélérer de façon très importante la cinétique de cytotoxicité des immunotoxines, comme le montre 10 l'expérience suivante.

Dans cette expérience, on a mesuré comme précédemment l'incorporation de traceur radioactif dans les cellules mais cette fois en fonction du temps d'incubation des cellules avec l'immuno-toxine, en absence et en présence de méthylamine 10 mM comme potentielisateur. Cette expérience a été réalisée sur le modèle cellulaire constitué par la lignée lymphoblastoïde humaine CEM avec 15 l'immunotoxine anti-T65 à la concentration de 50 mM. Les résultats sont présentés dans la figure 3.

Sur cette figure on a représenté les résultats obtenus 20 en portant en ordonnée le % d'incorporation de ^{14}C -leucine (% des témoins) et en abscisse le temps (en heures).

Pour cette lignée, il apparaît qu'en l'absence de potentialisation la cinétique de cytotoxicité est très lente comme le montre la courbe a. (D'autres expériences dans les mêmes conditions ont montré que le temps nécessaire à obtenir 50% de réduction de l'incorporation du traceur était de l'ordre de 20 h). Par contre, en présence de méthylamine une accélération spectaculaire de la cinétique se manifeste (courbe b) puisque le temps nécessaire à obtenir 50% d'inhibition d'incorporation est alors de l'ordre de 30 1,5 h seulement.

Un tel effet d'accélération est de la plus haute importance pour toutes applications des immunotoxines et en particulier pour les applications thérapeutiques *in vivo* car la rapidité d'action du médicament est toujours un facteur très favorable à l'efficacité 35 du traitement.

Exemple 2

En opérant comme dans l'exemple 1 mais en faisant varier l'amine utilisée on a déterminé la potentialisation de l'effet cytotoxique par une amine (exemple 1 point 1). L'effet 5 potentialisateur, exprimé en CI50 (cf. tableau I) avec l'immunotoxine anti-T65, est représenté dans le tableau III.

TABLEAU III

Potentialisateur	Concentration molaire amine	CI50 (molaire)
sans	-	$5 \cdot 10^{-9}$
diméthylamine	10^{-2}	$3 \cdot 10^{-12}$
amino-1 adamantan	10^{-3}	$8 \cdot 10^{-12}$

On peut donc utiliser en tant que médicament en thérapeutique humaine l'association constituée par une immunotoxine 15 et une amine telle que définie sous la forme de l'un quelconque de ses sels. Il peut être utilisé pour le traitement des affections, cancéreuses ou non, qui seraient sensibles à l'anticorps utilisé pour la préparation de l'immunotoxine.

Visant à éliminer la totalité des cellules cancéreuses 20 le traitement devra être effectué avec une dose suffisante d'immunotoxine associée avec une quantité d'amine pouvant varier de 10 mg à 2 g (exprimés en base) à chaque administration d'immunotoxine. La durée du traitement devra être déterminée dans chaque cas en fonction du sujet et de la nature de l'affection à traiter.

25 Les nouveaux médicaments selon l'invention sont conditionnés pour être utilisés par voie injectable et de préférence par voie intraveineuse.

De préférence les constituants de l'association seront conservés séparément et mélangés, seulement au moment de l'emploi, 30 dans la seringue ou le solvant de perfusion.



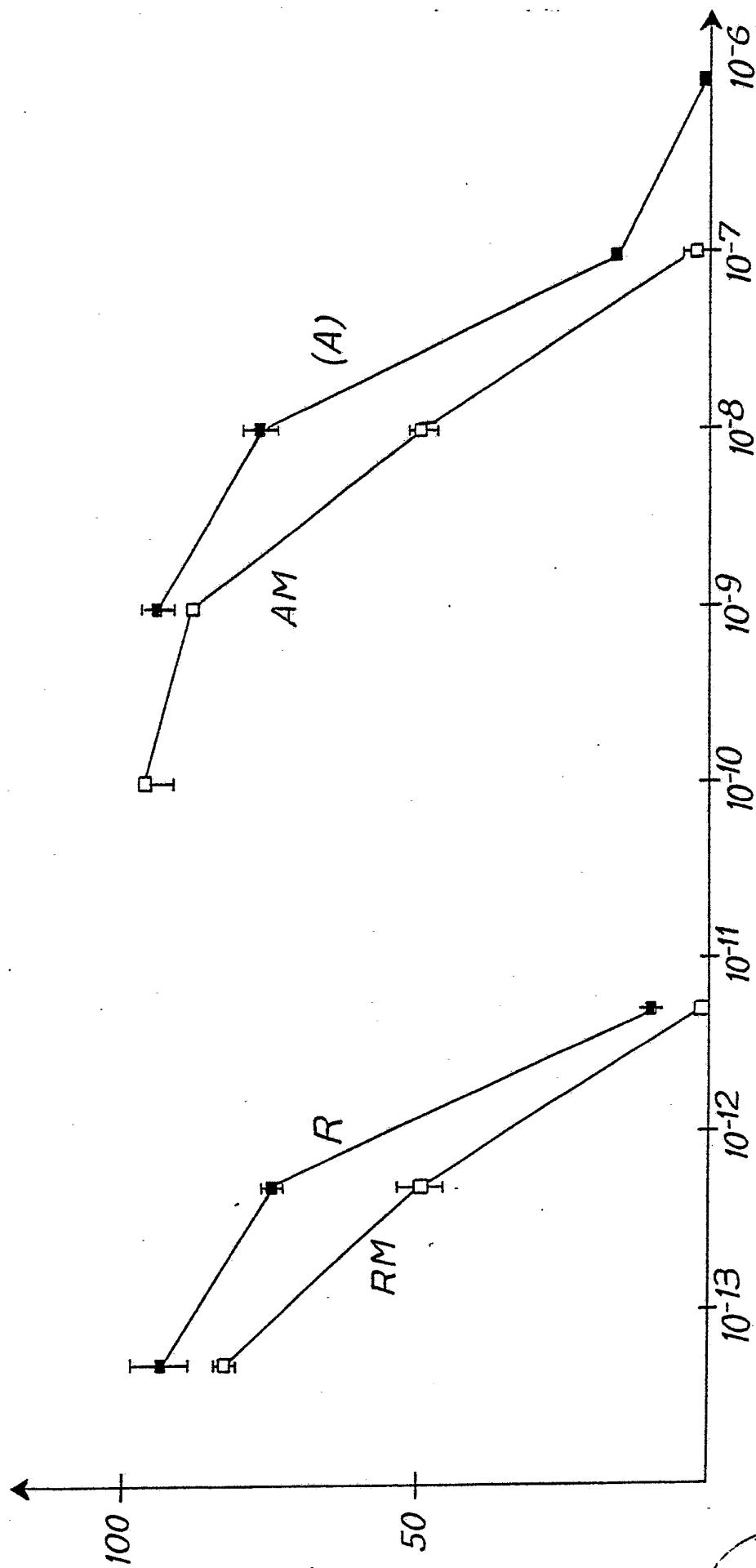
REVENDICATIONS

1. Médicaments cytotoxiques, caractérisés en ce qu'ils contiennent en association au moins une immunotoxine et une amine de formule R_1NHR_2 dans laquelle R_1 désigne l'hydrogène ou un alkyle inférieur et R_2 désigne un alkyle inférieur ou l'ensemble R_1NHR_2
- 5 5 représente l'amino-1 adamantane, ladite amine étant utilisée sous forme d'amine ou d'un sel d'amine pharmaceutiquement acceptable.
2. Médicaments selon la revendication 1, caractérisés en ce que l'amine utilisée est la méthylamine ou l'un de ses sels.
3. Médicaments selon la revendication 1, caractérisés
- 10 10 en ce qu'ils sont conditionnés pour être administrés par voie injectable, de préférence par voie intraveineuse.



1/3

Fig. 1



2/3

FIG. 2

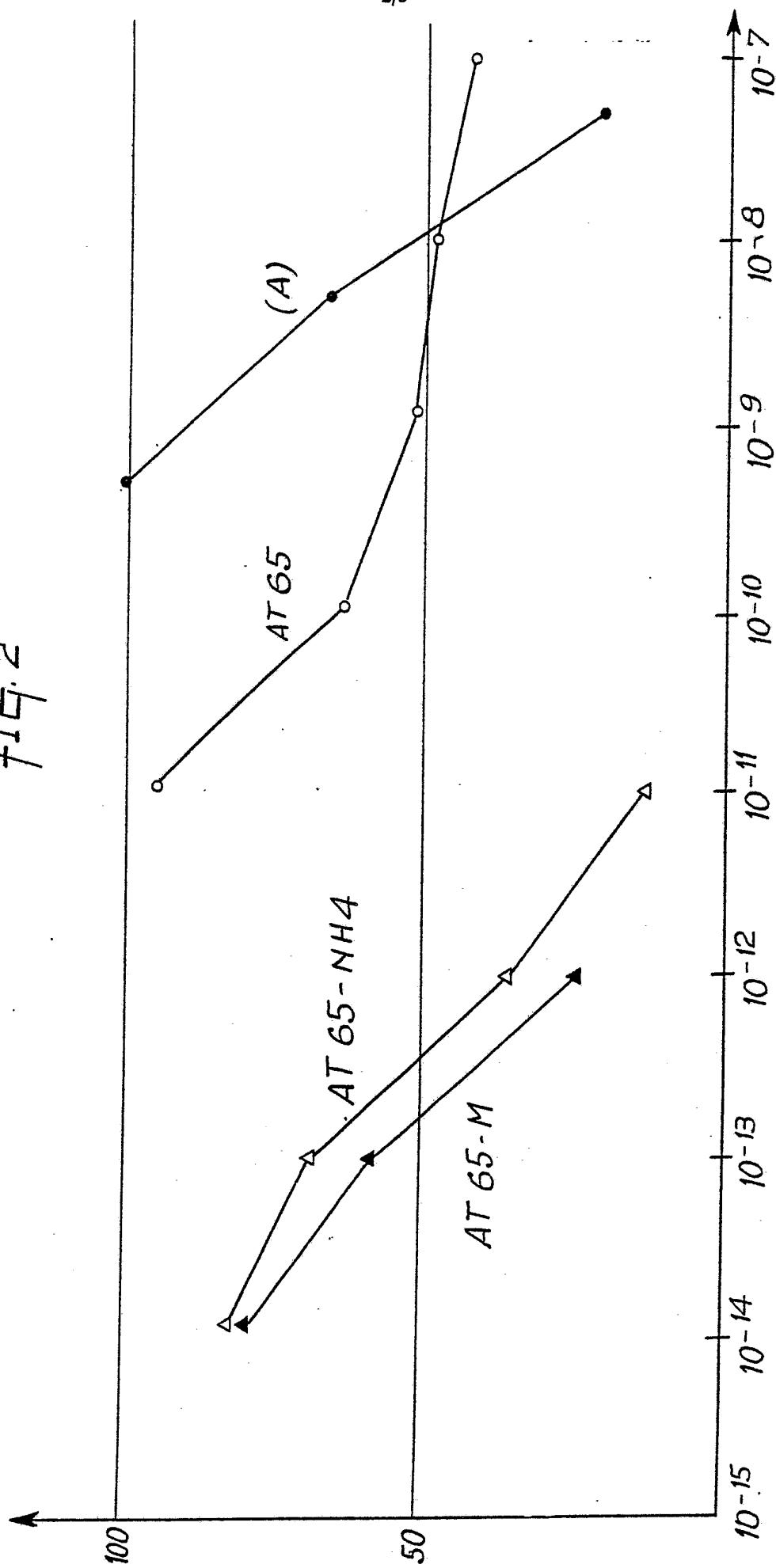
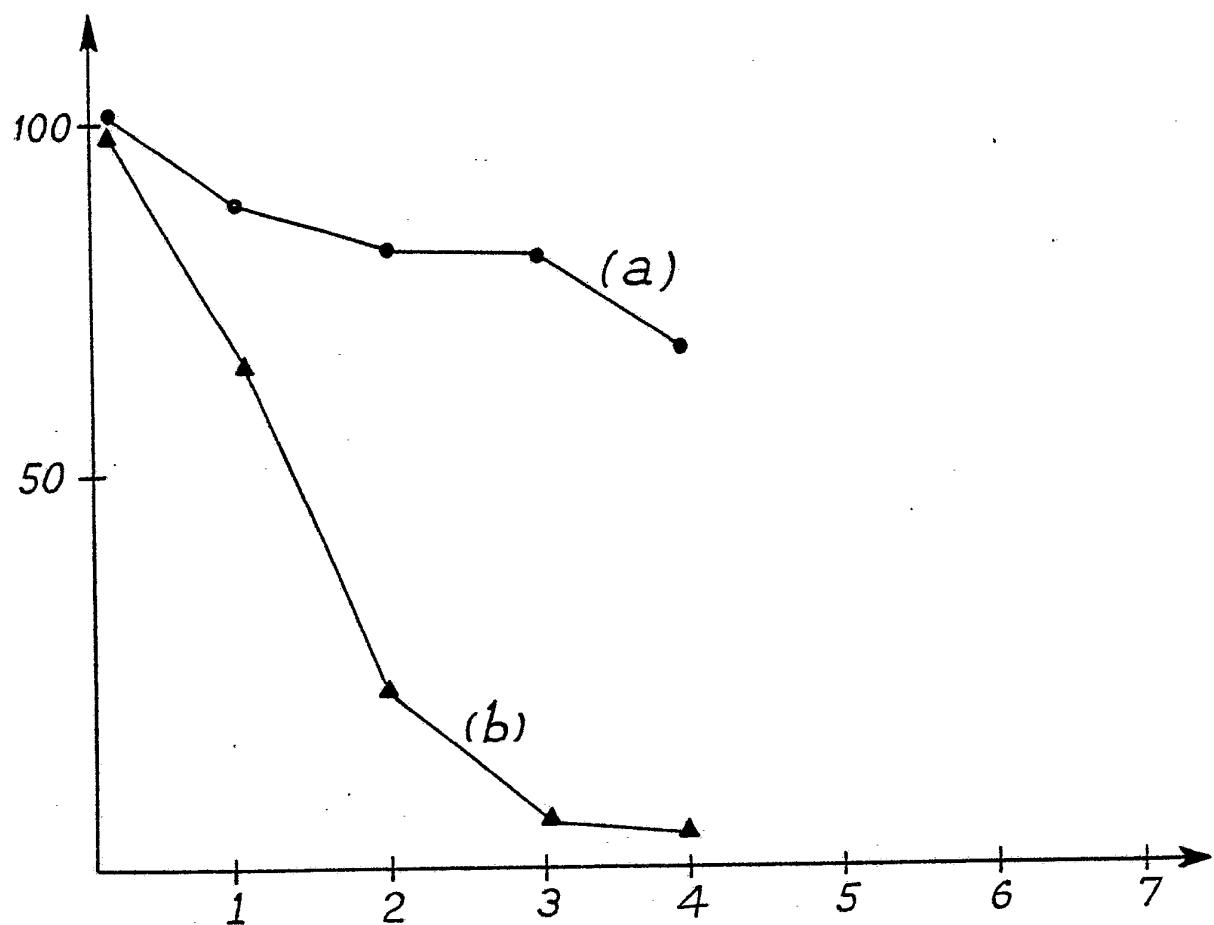


FIG. 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR83/00043

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ³

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

IPC³: A61K 39/395

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ⁴

Classification System	Classification Symbols
IPC ³	A61K

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁵

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹⁴

Category *	Citation of Document, ¹⁵ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸
Y	Biological Abstracts, vol. 73, issued in 1982 (Philadelphia, Pennsylvania, US) Y.J. Schneider et al.: "Effect of chloroquine and methylamine on endocytosis of fluorescein-labelled control immunoglobulin G and of anti-plasma membrane immunoglobulin G by cultured fibroblasts", see abstract 78102, Eur. J. Biochem., 1981, 118(1), 33-38 ---	1-3
Y	FR, A, 2466252 (CM INDUSTRIES), 10 April 1981, see the whole document -----	1-3

* Special categories of cited documents: ¹⁵

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search ⁹

31 May 1983 (31.05.83)

Date of Mailing of this International Search Report ²

06 July 1983 (06.07.83)

International Searching Authority ¹
European Patent Office

Signature of Authorized Officer ²⁰

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/FR 83/00043 (SA 4822)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 01/07/83

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A- 2466252	10/04/81	None	

For more details about this annex :
see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 83/00043

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ³

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

CIB. ³ : A 61 K 39/395

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ

Documentation minimale consultée ⁴

Système de classification	Symboles de classification
CIB. ³ :	A 61 K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁵

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁴

Catégorie ⁶	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹⁷	N° des revendications visées ¹⁸
Y	Biological Abstracts, vol. 73, issued in 1982 (Philadelphia, Pennsylvania, US) Y.J. Schneider et al.: "Effect of chloroquine and methylamine on endocytosis of fluorescein-labelled control immunoglobulin G and of anti-plasma membrane immunoglobulin G by cultured fibroblasts", voir résumé 78102, Eur. J. Biochem., 1981, 118(1), 33-38 --	1-3
Y	FR, A, 2466252 (CM INDUSTRIES) 10 avril 1981 voir le document en entier -----	1-3

* Catégories spéciales de documents cités: ¹⁵

- « A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- « E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- « L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- « O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- « P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive

« Y » document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.

* & * document qui fait partie de la même famille de brevets

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée ²

31 mai 1983

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale ²

06 JUIL. 1983

Administration chargée de la recherche internationale ¹

OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé ²⁰

G.L.M. Kruenberg

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE RELATIF

A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO. PCT/FR 83/00043 (SA 4822)

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche international visé ci-dessus. Lesdits membres sont ceux contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 01/07/83

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets	Date de publication
FR-A- 2466252	10/04/81	Aucun	

Pour tout renseignement concernant cette annexe :
voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No. 12/82

