

CH 676 122 A5



CONFÉDÉRATION SUISSE

OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

① CH 676 122 A5

⑤ Int. Cl.⁵: C 07 H 21/02

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein

Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

⑫ **FASCICULE DU BREVET** A5

⑲ Numéro de la demande: 2465/88	⑦ Titulaire(s): Nippon Shinyaku Co., Ltd, Minami-ku/Kyoto (JP)
⑳ Date de dépôt: 29.06.1988	
⑳ Priorité(s): 03.07.1987 JP 62-167433	⑦ Inventeur(s): Yano, Junichi, Nara-shi (JP) Ohgi, Tadaaki, Otsu-shi (JP)
㉔ Brevet délivré le: 14.12.1990	
④ Fascicule du brevet publié le: 14.12.1990	⑦ Mandataire: Novapat - Cabinet Chereau SA, Genève

⑤ **Polymères d'acides nucléiques.**

⑦ Polymères d'acides nucléiques à double brin apparentés à l'ARN, qui sont caractérisés en ce que la totalité de la répartition des masses moléculaires des dérivés entre dans l'intervalle de valeur de la constante de sédimentation de 4S à 13S ou en ce que les molécules correspondant au maximum de la répartition dans la distribution complète des tailles moléculaires des dérivés ont un nombre de bases entrant dans l'intervalle de 50 à 10 000. Ces polymères sont utilisables comme ingrédient actif pour une composition anti-tumorale ou une composition antivirale, car ils ont des activités physiologiques élevées et sont peu toxiques.

Description

La présente invention concerne des polymères d'acides nucléiques qui ont une activité physiologique, utilisables comme médicaments et qui sont peu toxiques.

5 Les acides nucléiques sont composés de cycles purine ou de cycles pyrimidine et de ribose ou de sucres analogues à l'état lié aux cycles, dans lesquels ces éléments constitutifs sont liés les uns aux autres par un pont phosphate pour former une structure en chaîne.

10 Parmi les acides nucléiques, l'ARN (polymère de ribonucléotide) est un composé macromoléculaire à structure en chaîne ayant le ribose comme sucre dans lequel les parties sucre sont liées les unes aux autres par un pont phosphate par la liaison diester. Dans les acides nucléiques à double brin, les parties cycles purine ou cycles pyrimidine des bases constituant l'acide nucléique (par exemple l'inosine, l'adénosine, la cytidine, l'uridine, etc.) sont liées par une liaison hydrogène «complémentaire» pour donner une stéréo-structure en hélice. Comme on s'attend à ce que les acides nucléiques ayant une structure à double brin possèdent des fonctions physiologiques utiles, de nombreuses études ont été effectuées jusqu'à présent sur ces acides nucléiques (Biochemical and Biophysical Research Communications, 58, 1974, etc.).

15 Parmi les acides nucléiques de cette espèce, un dérivé synthétique de l'ARN à double brin, l'acide polyinosinique.polycytidylique est désigné ci-après sous le nom de dérivé «poly-I.poly-C»; et l'acide polyinosinique qui est la partie constitutive de ce dérivé, est désigné sous le nom de «poly-I» et l'acide polycytidylique sous le nom de «poly-C».

20 Récemment, on a découvert que divers ARN naturels et synthétiques à double chaîne avaient une capacité d'induction de l'interféron (Field et coll. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 58, 1004, 1967; Field et coll. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 58, 2102, 1967; Field et coll., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 61, 340, 1968; Tytell et coll., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 58, 1719, 1967; Field et coll. J. Gen. Physiol., 56 905, 1970; De Clercq et coll., Methods in Enzymology, 78, 291, 1981).

25 Des exemples typiques des dérivés synthétiques connus de l'acide nucléique sont mentionnés ci-dessous.

Dérivés synthétiques de l'acide nucléique comme inducteur de l'interféron

30 (I) Complexes homopolymère.homopolymère (polymères d'acide nucléique à double brin ayant le poly-I.poly-C comme structure apparentée

(1) Dérivés modifiés par des bases

Acide polyinosinique.poly(acide 5-bromocytidylique);

35 Acide polyinosinique.poly(acide 2-thiocytidylique);

Acide poly(7-déazainosinique).acide polycytidylique;

Acide poly(7)déazainosinique).poly(acide 5-bromo- cytidylique).

(2) Dérivés modifiés par des sucres:

Poly(acide 2'-azidoinosinique).acide polycytidylique.

40 (3) Dérivés modifiés par l'acide phosphorique:

Acide polyinosinique.poly(acide cytidine-5'-thiophosphorique).

(II) Copolymères intermodifiés:

Poly(acide adénylique-acide uridylique).

(III) Complexes homopolymère.copolymère:

45 Acide polyinosinique.poly(acide cytidylique, acide uridylique);

Acide polyinosinique.poly(acide cytidylique, acide 4-thiouridylique).

(IV) Complexes acide synthétique /Polycation:

Acide polyinosinique.acide polycytidylique, po ly-L-lysine

(désigné ci-après sous le nom de «poly-ICLC»).

50 (V) Autres:

Acide polyinosinique.poly(acide 5-vinylcytidylique).

55 Comme il a été indiqué ci-dessus, divers types d'ARN à double brin, en particulier des dérivés comprenant le poly-I.poly-C comme corps apparenté, ont été signalés ces dernières années. Il existe une théorie bien établie sur une série de dérivés de l'acide nucléique comprenant ceux-ci en ce qui concerne les relations entre la structure des dérivés et leurs fonctions (De Clercq et coll. Texas Reports on Biology and Medicine, 41, 77, 1982).

60 En particulier, ces auteurs indiquent dans leur rapport que des polymères d'acide nucléique ayant la capacité de produire des interférons doivent être des substances macromoléculaires ayant une valeur de la constante de sédimentation de 4S ou davantage.

Comme autre action physiologique du poly-I. poly-C, le dérivé est connu pour avoir une activité d'inhibition de la propagation de cellules cancéreuses transplantées sur l'animal (Levy et coll., Proc. Nat. Acad. Sci., U.S., 62, 357, 1969).

65 On pense que cette activité contribue également à une fonction d'activation de la bioimmunité (Karter et coll. J. Immunol. 104, 1035, 1970).

Ainsi on s'attendait initialement à ce que le poly-I.poly-C puisse être utilisé cliniquement en raison de son activité antivirale et de son activité cancérostatique mais on a trouvé de manière inattendue que le dérivé avait une forte toxicité. En conséquence, il se pose un problème pour l'utilisation du dérivé pour l'administration à l'homme. Cependant, l'utilisation comme médicament du dérivé du poly-I.poly-C est toujours à l'essai à l'heure actuelle.

Levy et coll. ont mis au point un poly-ICLC ayant une forte activité productrice de l'interféron (Levy et coll. Texas Reports on Biology and Medicine, 41, 653, 1982).

Bien qu'on puisse s'attendre à ce que le poly-I.poly-C mentionné ci-dessus et ses dérivés présentent un degré suffisant de divers effets utiles, la toxicité n'a pas pu être contournée dans la plupart des cas (De Clercq et coll. Infect. Immuni., 6, 344, 1972), et par conséquent, il est nécessaire de disposer de moyens pour l'application de ces substances à l'organisme humain.

La demanderesse a étudié de manière continue les fonctions de divers acides nucléiques sur la base de la technique antérieure mentionnée ci-dessus pendant une durée prolongée et elle a trouvé que, en réglant la longueur des chaînes des dérivés d'acide nucléique à double brin, la toxicité des dérivés peut être très fortement réduite tandis que leurs activités physiologiques nécessaires peuvent être conservées telles quelles et elle a ainsi abouti à la présente invention.

En conséquence, l'aspect caractéristique de la présente invention réside dans la limitation de la longueur des chaînes des polymères d'acide nucléique à double brin dans un intervalle défini.

Les polymères d'acide nucléique à double brin selon l'invention sont tels que spécifiés dans la revendication 1.

La figure 1 représente un diagramme d'éluion de filtration sur gel par HPIC des dérivés d'acide nucléique de la présente invention.

La demanderesse s'est intéressée précédemment au fait que le poly-I.poly-C en tant que produit commercial ou en tant que produit préparé par synthèse par une réaction classique est toxique et elle a effectué des études répétées de manière à éclaircir la cause de la toxicité des dérivés. Ainsi, elle a abouti à un effet significatif et en conséquence elle a déposé des demandes de brevet à l'Office japonais des Brevets (demande de brevet japonais n° 61 001 076 et une autre demande de brevet japonais avec la priorité de cette demande de brevet n° 61 001 076) qui concerne des dérivés d'acide nucléique ayant une structure d'un ordre plus élevé. Par la suite, elle a effectué d'autres études sur le sujet et elle a trouvé à présent un autre fait nouveau, et elle a ainsi réalisé la présente invention qui sera décrite en détail ci-après.

La demanderesse a examiné des polymères d'acide nucléique en ce qui concerne à la fois l'activité d'inhibition des cellules cancéreuses dans des souris portant les cancers et les propriétés de léser les cellules souche de moëlle de souris comme indices, et elle a découvert les faits suivants: lorsque des polymères d'acide nucléique ont une répartition des tailles moléculaires correspondant à plus de 13S comme constante de sédimentation, les polymères sont actifs et sont toxiques; lorsque les polymères d'acide nucléique ont une répartition des tailles moléculaires correspondant à une constante de sédimentation de 4S à 13S, les polymères sont actifs, mais leur toxicité est extrêmement faible, et lorsque les polymères d'acide nucléique ont une répartition des tailles moléculaires inférieure à 4S, les polymères ne sont ni toxiques ni actifs.

Le fait que les dérivés du poly-I.poly-C ayant une constante de sédimentation inférieure à 4S sont inactifs correspond presque au rapport de Declark précité, mais aucune indication n'a été donnée jusqu'à présent, à propos des polymères d'acide nucléique, en ce qui concerne les relations entre leur longueur de chaîne et leur toxicité.

La demanderesse a été la première à trouver que le réglage de la taille moléculaire (longueur de chaîne) du poly-I.poly-C et de ses dérivés pour qu'elle soit dans un intervalle déterminé est le facteur le plus important pour réduire notablement la toxicité des acides nucléiques polymères.

Conformément à la présente invention, la répartition des tailles moléculaires des dérivés d'acides nucléiques à régler est de préférence dans l'intervalle correspondant à une valeur de la constante de sédimentation de 4S à 13S (c'est-à-dire dans l'intervalle de 50 à 10 000 bases du dérivé du polymère).

Dans cet intervalle, la longueur de chaîne dans la répartition maxima comprend généralement environ 100 à 600 bases.

Une paire de bases (désignée ci-après par «pb») qui est généralement utilisée comme l'unité pour représenter la taille moléculaire des acides nucléiques peut être utilisée pour représenter la taille moléculaire d'acides nucléiques par le nombre des bases constituant l'acide nucléique. (Par exemple, 10 pb désignent un polymère à double brin ayant 10 bases). Dans le présent mémoire, il est également fait référence à d'autres polymères d'acide nucléique que les polymères à double brin en plus des polymères d'acide nucléique et par conséquent le terme «nombre de bases» est utilisé ici à la place de «pb» pour représenter la taille moléculaire des acides nucléiques. (Par exemple, un polymère d'acide nucléique ayant un «nombre de bases de 10» signifie que le polymère a 10 bases.

Lorsque la taille moléculaire d'un acide nucléique doit être déterminée ou identifiée, on utilise en général une «valeur de la constante de sédimentation» (valeur S). Cependant, la demanderesse a pu obtenir le nombre de bases mentionné ci-dessus des acides nucléiques au moyen de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en utilisant une colonne de filtration sur gel ou une électrophorèse (décrite ci-dessous en détail), dans laquelle des ADN à double brin (fragments d'ADN de phage M13) ayant des

tailles moléculaires connues sont utilisés comme marqueurs et le nombre de bases de l'acide nucléique à déterminer est calculé sur la base du nombre du témoin.

Jusqu'à présent, la valeur de la constante de sédimentation (valeur S) a été largement utilisée pour la représentation de la masse moléculaire des acides nucléiques macromoléculaires. Les acides nucléiques macromoléculaires qui existent dans le commerce sont représentés au moyen de leur valeur S. Cependant, en raison du progrès des techniques expérimentales ces dernières années, un moyen pour déterminer plus précisément la masse moléculaire des substances macromoléculaires a été mis au point en utilisant l'électrophorèse sur gel, la chromatographie sur gel, la chromatographie par échange d'ions, etc. de telle sorte que la détermination de la longueur de chaîne de l'acide nucléique macromoléculaire est devenue possible. Dans ces conditions, la relation entre la représentation par la valeur S et la représentation par la longueur de chaîne devient problématique. En particulier, comme les molécules d'acide nucléique respectives ont leurs valeurs intrinsèques dans le cas de la représentation par la valeur S, le point de savoir si oui ou non la représentation par la valeur S et la représentation par la longueur de chaîne pourraient correspondre exactement l'une à l'autre comme moyen de représenter la masse moléculaire des acides nucléiques ne pose pas toujours de problème.

En conséquence, pour la présentation de la masse moléculaire des polymères d'acides nucléiques de la présente invention, la représentation par la valeur S est également utilisée dans la description du présent mémoire conformément à la manière classique dans le domaine de la chimie des acides nucléiques. Cependant, comme la «valeur S» est une valeur obtenue par une méthode de mesure de la masse moléculaire des acides nucléiques macromoléculaires sous la forme d'une masse moléculaire prise comme un tout (ou sous la forme d'un état moléculaire de la substance), la représentation sur la base de la mesure de la longueur de chaîne de la substance (qui est le «nombre de bases» auquel il est fait référence ici) est également mentionnée en même temps que la «valeur S». Ceci provient en particulier de ce que la limite de la distribution des masses moléculaires doit être représentée de manière plus précise dans la réalisation de la présente invention.

Comme dérivés d'acide nucléique de la présente invention on peut citer ceux obtenus en calibrant (en raccourcissant les chaînes) des dérivés d'acide nucléique synthétiques précités. Des dérivés ainsi calibrés ont la même structure essentielle que le poly-I.poly-C. Cependant, les dérivés d'acide nucléique de la présente invention sont caractérisés par la définition spécifique de la répartition des masses moléculaires de leurs dérivés.

Comme dérivés d'acide nucléique de la présente invention, on peut par exemple, mentionner les substances suivantes:

Acide polyinosinique.poly(acide 5-bromocytidylique) ayant une valeur S de 4 à 13, de préférence ceux dans lesquels les molécules au maximum de la répartition moléculaire ont un nombre de bases de 100 à 600.

Acide polyinosinique.poly(acide 2-thiocytidylique) ayant une valeur S de 4 à 13, de préférence ceux dans lesquels les molécules, au maximum de la répartition moléculaire, ont un nombre de bases de 100 à 600.

Poly(acide 7-déazainosinique).acide polycytidylique ayant une valeur S de 4 à 13, de préférence ceux pour lesquels les molécules, au maximum de la répartition moléculaire, ont un nombre de bases de 100 à 600.

poly(acide 7-déazainosinique).poly(acide 5-bromocytidylique) ayant une valeur S de 4 à 13, de préférence ceux pour lesquels les molécules, au maximum de la répartition moléculaire, ont des nombres de bases de 100 à 600.

poly(acide 2'-azidoinosinique), acide polycytidylique ayant une valeur S de 4 à 13, de préférence ceux pour lesquels les molécules, au maximum de la répartition moléculaire, ont un nombre de bases de 100 à 600.

Acide polyinosinique.poly(acide cytidine-5'-thiophosphorique) ayant une valeur S de 4 à 13, de préférence ceux pour lesquels les molécules, au maximum de la répartition moléculaire, ont un nombre de bases de 100 à 600.

Poly(acide adénylique-acide uridylique) ayant une valeur S de 4 à 13, de préférence ceux pour lesquels les molécules, au maximum de la répartition moléculaire, ont un nombre de bases de 100 à 600.

Acide polyinosinique.poly(acide cytidylique, acide uridylique) ayant une valeur S de 4 à 13, de préférence ceux pour lesquels les molécules, au maximum de la répartition moléculaire, ont un nombre de bases de 100 à 600.

Acide polyinosinique.acide polycytidylique.poly-L-lysine ayant une valeur S de 4 à 13, de préférence ceux pour lesquels les molécules, au maximum de la répartition moléculaire, ont un nombre de bases de 100 à 600.

Acide polyinosinique.poly(acide 1-vinylcytidylique) ayant une valeur de S de 4 à 13, de préférence ceux pour lesquels les molécules, au maximum de la répartition moléculaires, ont un nombre de bases de 100 à 600.

Pour la préparation des dérivés d'acide nucléique de la présente invention, les parties chaîne latérale phosphate des polymères précités ou des dérivés de polymère (I) à (V) précités peuvent être clivés de telle sorte que les polymères ou les dérivés de polymère peuvent être divisés en substances de faible masse moléculaire.

Pour le clivage des polymères ou des dérivés de polymère, on peut utiliser la dégradation thermique (décrite en détail ci-dessous) ainsi qu'une hydrolyse limitée par les alcalis, ou une hydrolyse partielle avec de la RNase, etc.

5 C'est seulement pour l'aspect caractéristique des dérivés d'acide nucléique de la présente invention résultant de la limitation de la répartition de leur taille de molécules à un intervalle particulier en raison du clivage des parties de chaîne latérale phosphate mentionné ci-dessus dans les dérivés, pour diviser ainsi les dérivés en composés de faible masse moléculaire, que l'effet de la présente invention qui comprend (1) l'augmentation de l'activité physiologique et (2) l'augmentation de la sécurité peut être obtenue.

10 L'activité physiologique des dérivés d'acide nucléique de la présente invention est extrêmement utile pour les médicaments. Les dérivés d'acide nucléique de la présente invention ont une activité cancérostatique qui sera décrite ci-dessous en détail. Cette activité n'est qu'une des diverses autres activités physiologiques des dérivés d'acide nucléique de la présente invention.

15 En ce qui concerne les autres activités physiologiques des dérivés d'acide nucléique de la présente invention qui ont le poly-I.poly-C comme corps apparenté on peut encore citer la capacité de produire du TNF, la capacité de produire de l'interféron, la capacité de produire de l'interleukine 2-, la capacité d'activer les macrophages, la capacité d'activer les cellules NK, l'activité d'inhibition de la prolifération des cellules tumorales, l'activité d'inhibition de la prolifération des cellules tumorales dans des souris rasées portant des cellules tumorales humaines, l'activité d'inhibition des métastases des cellules tumorales dans le poumon etc.

Les dérivés d'acide nucléique de la présente invention ont une sécurité beaucoup plus élevée que le poly-I.poly-C classique et les inducteurs de l'interféron analogues. En conséquence, les composés de la présente invention sont utiles comme agent antiviral, comme agent anti-tumoral, etc.

25 Pour l'utilisation des dérivés d'acide nucléique de la présente invention comme médicaments, les dérivés peuvent être administrés directement à des animaux y compris l'homme, ou encore ils peuvent être ajoutés à un support non toxique et inerte pharmaceutiquement acceptable, pour donner une composition médicamenteuse contenant par exemple l'ingrédient actif à une concentration de 0,1% à 99,5%, de préférence de 0,5% à 90%, et la composition médicamenteuse obtenue peut être administrée aux animaux y compris l'homme.

30 Comme support, on peut utiliser un ou plusieurs adjuvants médicamenteux tels qu'un diluant liquide, solide ou semi-solide, une charge, etc. On préfère que la composition médicamenteuse soit administrée sous forme de dose unitaire. Les dérivés d'acide nucléique de la présente invention peuvent être administrés par diverses voies d'administration, par exemple par administration orale, par administration locale à des tissus, ou par administration rectale. Il est évident que la composition médicamenteuse est utilisée sous la forme de préparation qui convient pour ces modes d'administration, par exemple, sous la forme de diverses préparations orales, solutions pour injection, inhalation, solution ophtalmique, pommade, suppositoire, etc. En particulier, l'application à des tissus et l'administration locale sont particulièrement préférées pour l'administration de compositions médicamenteuses de la présente invention.

40 Il est souhaitable que la dose de la composition médicamenteuse de la présente invention comme remède pour les tumeurs malignes soit déterminée de manière appropriée en tenant compte de l'état du malade, par exemple de son âge et de son poids, ainsi que de la voie d'administration et des symptômes et de la gravité de la maladie. En général, la composition est administrée à des adultes dans une quantité de 0,05 à 1000 mg/par dose comme quantité de l'ingrédient actif de dérivé de l'acide nucléique de la présente invention. On préfère, en général, administrer une perfusion intraveineuse à raison de 5 à 100 mg de ce dérivé. Suivant le cas, une quantité plus faible que celle indiquée ci-dessus peut être suffisante, ou au contraire, une quantité plus élevée que celle indiquée ci-dessus peut devenir nécessaire. Dans l'administration effective, la composition peut être administrée une fois à plusieurs fois par jour à des intervalles d'un jour à plusieurs jours.

50 Lorsque la composition médicale de la présente invention est utilisée comme remède pour les tumeurs bénignes ou des maladies virales, il est encore souhaitable de déterminer la dose en tenant compte des symptômes et de la gravité de la maladie, de la voie d'administration et de l'état du malade, etc. En général, la dose peut être dans l'intervalle allant de la même quantité que la dose pour le remède précité pour des tumeurs malignes à plusieurs dixièmes de celle-ci.

55 Les dérivés d'acide nucléique de la présente invention peuvent être utilisés en même temps que divers modificateurs de réponse biologique (BRM) et que divers cancérostatiques qui seront mentionnés ci-dessous. Dans l'utilisation en association, on peut s'attendre à un effet synergique dû à la fois à cet ingrédient supplémentaire et au dérivé d'acide nucléique de la présente invention, en même temps qu'à une réduction des effets secondaires nuisibles de ce dernier dérivé.

60 Exemples de BRM:

Interférons (α , β , τ);
 Interleukines (IL-1, IL-2);
 CSF (facteur stimulant les colonies);
 65 TNF (facteur de nécrose des tumeurs);

Levamisole, Bestatine, Acide rétinoïque,
cellules LAK., etc.

Exemples de cancérostatiques :

- 5
10
15
20
25
30
35
- 5-FU (5-fluorouracile);
Ara-C (Cytosine Arabinoside);
Ara-A (Adénine Arabinoside);
CDDP (Cisplatine);
Cyclophosphamide;
AZT (Azidothymidine).

Activités physiologiques des dérivés d'acide nucléique de l'invention:

- 15 Les activités physiologiques des dérivés d'acide nucléique de la présente invention seront décrites ci-dessous.

Activité d'inhibition de prolifération des cellules tumorales chez les souris portant des tumeurs:

- 20 L'activité d'inhibition de la prolifération des cellules tumorales chez des souris portant une tumeur Meth-A (souris portant un cancer transplanté de manière isologue) a été examinée par la méthode suivante. Des cellules de Meth-A (3×10^5 / 0,2 ml) ont été mises en suspension dans une solution saline physiologique, et la suspension obtenue a été injectée par voie sous-cutanée à des souris balb/c (âgées de 5 semaines, mâles). Deux jours après l'injection, la substance active à examiner (substance d'essai) a été injectée par voie intraveineuse aux souris à raison de trois fois par semaine pendant 2 semaines. Deux jours après l'injection finale, la partie des cellules tumorales a été prélevée et son poids a été mesuré. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau ci-dessous.

- 30 La substance d'essai (I) poly-I.poly-C ayant une répartition des masses moléculaires supérieure à 13S; la substance d'essai (II) est un poly-I.poly-C ayant une répartition des masses moléculaires de 4S à 13S (valeur S = 8), la substance d'essai (III) est un poly-I.poly-(C₁₂, U) (à savoir, un dérivé de poly-C dans lequel les acides cytidyliques sont remplacés par un acide uridylique à raison d'un acide uridylique pour 12 acides cytidyliques) ayant une répartition des tailles moléculaires de plus de 13S; et la substance d'essai (IV) est un poly-I.poly(C₁₂, U) ayant une répartition des tailles moléculaires de 4S à 13S (valeur S = 9).

- 35 Le groupe témoin n'a reçu qu'une administration de solution saline physiologique.

	Substance d'essai (µg/souris)	Nombre de souris essayées	Moy. ± écart-type	Inhibition %
40	Témoin	10	2,73 ± 0,21	—
	Substance d'essai (I) (100)	10	0,46 ± 0,05	83*
	Substance d'essai (II) (100)	10	1,01 ± 0,17	63*
45	Substance d'essai (III) (100)	10	0,69 ± 0,04	73*
	Substance d'essai (IV) (100)	10	1,80 ± 0,20	34*

(*): P < 0,01 pour une différence significative.

- 50 Le tableau ci-dessus montre clairement que les dérivés d'acide nucléique de la présente invention ont un effet significatif d'inhibition de la prolifération des cellules tumorales chez des souris portant des cancers.

Activité d'inhibition des métastases des cellules tumorales dans le poumon:

- 55 Des cellules de mélanome transplantables de manière isologue B16F10 (2×10^5) ont été implantées dans des souris C57BL/6 (mâles, âgées de 5 semaines) dans leur veine. Deux semaines après l'implantation, on compte le nombre de nodosités transplantées dans le poumon (le nombre de colonies). On administre la substance d'essai aux animaux par voie intraveineuse 24 heures avant la transplantation de cellules de mélanome B16F10 dans leur veine. Le nombre des animaux d'essai est de 9. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau ci-dessous. La substance d'essai (I), la substance d'essai (II) et le témoin étaient les mêmes que ci-dessus.

65

Substance d'essai	Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Nombre de colonies		Inhibition %
Témoïn	–	85	5	
Substance d'essai (I)	5	25	8*	71
	50	11	3*	87
	500	1	1*	99
Substance d'essai (II)	5	58	8*	33
	50	24	7*	72
	500	13	2*	84

(*): $P < 0,01$ pour une différence significative.

15 Le tableau ci-dessus montre clairement que les dérivés d'acide nucléique de la présente invention ont un effet significatif d'inhibition des métastases des cellules tumorales dans le poumon chez la souris.

Sécurité des dérivés d'acide nucléique de l'invention:

20 La sécurité des dérivés de l'acide nucléique de la présente invention a été déterminée comme il est indiqué ci-dessous.

Cytotoxicité pour des cellules souche de moëlle de souris

25 Les dérivés d'acide nucléique de la présente invention ont été examinés en ce qui concerne la cytotoxicité pour des cellules souche de moëlle de souris. La substance d'essai (I), la substance d'essai (II), la substance d'essai (III) et la substance d'essai (IV) étaient les mêmes que ci-dessus. Pour le groupe témoin, on a administré seulement une solution saline physiologique.

30 Chacune des substances d'essai a été injectée par voie intraveineuse à des souris Balb/c (âgées de 8 semaines, mâles) à raison de 0,5 mg/kg. Chacun des groupes d'essai comprenait cinq souris. 24 heures après l'injection, les cellules de moëlle ont été prélevées sur chaque souris. Les cellules ont été fixées puis colorées avec de la coloration de Giemsa. Les cellules du frottis ont été examinées au microscope, et le pourcentage de variation a été calculé sur la base du nombre des réticulocytes apparus conformément à la formule suivante:

35

$$\text{Pourcentage de variation (\%)} = \frac{(\text{témoin}) - (\text{groupe d'essai})}{(\text{groupe d'essai})} \times 100$$

40

Le résultats obtenus sont représentés dans le tableau ci-dessous.

	Pourcentage de variation (%)
Substance d'essai (I)	61
Substance d'essai (II)	0
Substance d'essai (III)	59
Substance d'essai (IV)	0

50

Le tableau ci-dessus montre clairement que les dérivés d'acide nucléique de la présente invention ont une sécurité extrêmement élevée.

55

Essai de toxicité aiguë:

L'essai de toxicité aiguë a été effectué en utilisant des souris balb/c. La substance d'essai a été administrée par voie intraveineuse à des souris en une seule fois, et la DL_{50} a été calculée à partir du nombre de souris mortes au bout d'une semaine. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau ci-dessous.

60

65

CH 676 122 A5

Animal d'essai	Voie d'administration	DL ₅₀ Substance d'essai (I)	Substance d'essai (II)
Souris balb/c	i.v.	35 mg/kg	> 150 mg/kg

Comme il ressort clairement du tableau ci-dessus, la toxicité de la substance d'essai (II) est très inférieure à celle de la substance d'essai (I). Il est donc clair que la toxicité est en relation étroite avec la longueur de chaîne des dérivés d'acide nucléique.

Les exemples suivants sont destinés à illustrer la préparation des dérivés d'acide nucléique de la présente invention d'une manière plus détaillée, mais non à limiter le domaine de la présente invention.

EXEMPLE

(1) Préparation de dérivés d'acide nucléique à double brin

On dissout des quantités équimolaires de poly-C du commerce (ayant une valeur S de 6 à 12) et de poly-I (ayant une valeur S de 6 à 12) dans un tampon Tris contenant du NaCl 50 mM pour préparer une solution ayant une concentration de 10 à 20 mg/ml. On la chauffe progressivement dans un bain-marie de la température ambiante à 68°C. On la maintient ensuite à 68°C pendant environ 10 minutes, puis on la laisse refroidir spontanément à la température ambiante. On la stocke alors à 4°C.

On lyophilise la solution ainsi préparée pour obtenir 1,2 g de dérivé d'acide nucléique sous la forme d'un solide blanc.

Celui-ci est la substance d'essai (I) mentionnée ci-dessus (ayant une valeur S de 13 à 24).

De la même manière que ci-dessus, excepté qu'on utilise un copolymère de poly(C₁₂, U) à la place du poly-C, on obtient un poly-I.poly(C₁₂, U) (substance d'essai (III) ayant une valeur S de 13 à 24).

Comme le procédé ci-dessus est général, tous les dérivés d'acide nucléique mentionnés dans ce qui précède, peuvent également être préparés de la même manière que le poly-I.poly-C.

(2) Transformation de dérivés d'acide nucléique en composés de faible masse moléculaire :

On dissout 1 g de la substance d'essai (I) obtenue dans le stade (1) ci-dessus dans 120 ml d'eau, et on y ajoute 30 ml d'une solution de NaCl 5M et 150 ml de formaldéhyde. On agite énergiquement le mélange obtenu, ce qui donne une solution homogène. Après avoir chauffé la solution réactionnelle à 80°C pendant 8 heures, on la dialyse complètement contre de l'eau et on la lyophilise, ce qui donne 0,95 g d'un solide blanc.

Celui-ci est la substance d'essai (II) (ayant une valeur S de 8).

On dissout 1 g de la substance d'essai (III) obtenu dans le stade (I) ci-dessus dans 120 ml d'eau, et on y ajoute 30 ml d'une solution de NaCl 5M et 150 ml de formaldéhyde. On agite énergiquement le mélange obtenu, ce qui donne une solution homogène. Après avoir chauffé la solution réactionnelle à 60°C pendant 12 heures, on la dialyse complètement contre de l'eau puis on la lyophilise, ce qui donne 0,95 g d'un solide blanc.

Celui-ci est la substance d'essai (IV) (ayant une valeur S de 9).

La figure 1 représente un diagramme d'élution dans une chromatographie liquide à haute performance par filtration sur gel des substances d'essai respectives, dans lequel l'absorbant à 260 nm est en ordonnées, et le temps de rétention (en minutes) et le nombre de pb correspondants sont en abscisses. (1) est la substance d'essai (I), (2) est la substance d'essai (III), (3) est la substance d'essai (IV) et (4) est la substance d'essai (II).

Les conditions de l'HPLC sont les suivantes: on utilise un gel TSK une colonne de filtration sur gel G-DNA-PW. L'élution a été effectuée avec de l'EDTA 1 mM et une solution de NaCl 0,3M contenant un tampon tris-HCl (pH 7,5). La vitesse d'élution est de 0,2 ml/min et le temps d'élution est indiqué au-dessus du diagramme d'élution respectif (axe des abscisses). Une longueur d'onde d'absorption ultraviolette de 260 nm est utilisée pour la détection, et l'absorbance pour la totalité de la graduation de 0,04 DO/ml est indiquée sur l'axe des ordonnées du graphique.

Le chiffre pour les marqueurs indiqué au-dessous de l'axe des abscisses (pb) désigne le nombre de bases du DNA.

Comme marqueurs, on a utilisé les fragments hydrolysés de RR-DNA de phage M13 hydrolysés par des enzymes de restriction.

Le diagramme d'élution des substances d'essai (I) ((1) dans le dessin) et celui de la substance d'essai (III) ((2) dans le dessin) se ressemblent bien l'un à l'autre, les courbes du diagramme d'élution apparaissant 34 minutes après l'application de l'échantillon dans chaque cas. Le pic indique la région vide de la colonne, d'où l'on conclut que la quasi-totalité des constituants de ces substances d'essai ont un nombre de bases de 6000 ou davantage.

En outre, on observe que la répartition des tailles moléculaires des substances d'essai de faible masse moléculaire, de la substance d'essai (II) ((4) dans le dessin) et de la substance d'essai (IV) ((3) dans le dessin) tombent dans une plage déterminée, et la répartition moléculaire maxima (pic) apparaît au voisinage de 150 (nombre de bases) et de 600 (nombre de bases) pour ces substances d'essai de faible masse moléculaire.

Si la taille moléculaire est représentée par le «nombre de bases» l'unité du «nombre de bases» peut être la même que celle des «pb» de la figure 1.

Par exemple, du poly-I.poly-C a été traité pour être clivé dans les substances de faible masse moléculaire constitutives, après quoi, on a diversément modifié le temps de réaction et la température de réaction. La répartition des tailles moléculaires (nombre de bases et la répartition des tailles moléculaires (nombre de bases) sont indiquées ci-dessous pour les substances de faible masse moléculaire obtenues par ce procédé.

Température de réaction	Temps de réaction	Répartition moléculaire maxima (nombre de bases)	Répartition moléculaire (nombre de bases)
—	0 h	—	> 10 000
80°C	24 h	30	10–55
80°C	16 h	100	50–800
60°C	8 h	1000	200–6000
60°C	12 h	600	50–5000

Dans l'exemple ci-dessus, un ARN à double brin a été traité pour être clivé dans des substances de faible masse moléculaire. D'une manière analogue, un ARN à brin unique peut également être traité exactement de la même manière.

La présente invention n'est pas limitée aux exemples de réalisation qui viennent d'être décrits, elle est au contraire susceptible de modifications et de variantes qui apparaîtront à l'homme de l'art.

Revendications

1. Polymères d'acides nucléiques à double brin apparentés à l'ARN, caractérisés en ce que la totalité du domaine de répartition de leurs tailles moléculaires est comprise dans l'intervalle correspondant aux valeurs de la constante de sédimentation de 4S à 13S ou en ce que les molécules pour la répartition maximale dans toute la distribution de leurs tailles moléculaires ont un nombre de bases dans l'intervalle de 50 à 10 000.

2. Polymères d'acides nucléiques à double brin selon la revendication 1, qui sont choisis dans le groupe constitué de l'acide polyinosinique.poly(acide 5-bromocytidylique) ayant une valeur S de 4 à 13, de préférence ceux pour lesquels les molécules correspondant au maximum de la répartition moléculaire ont un nombre de bases de 100 à 600; un acide polyinosinique.poly(acide 2-thiocytidylique) ayant une valeur S de 4 à 13, de préférence ceux dont les molécules correspondant à la répartition moléculaire maximale ont un nombre de bases de 100 à 600; un poly(acide 7-déazainosinique).acide polycytidylique ayant une valeur S de 4 à 13, de préférence ceux dont les molécules correspondant à la répartition moléculaire maximale ont un nombre de bases de 100 à 600; un poly(acide 7-déazainosinique).poly(acide 5-bromocytidylique) ayant une valeur de S de 4 à 13, de préférence ceux dont les molécules correspondant à la répartition moléculaire maximale ont un nombre de bases de 100 à 600; un poly(acide 2'-azidoinosinique).acide polycytidylique ayant une valeur de S de 4 à 13, de préférence ceux dont les molécules correspondant à la répartition moléculaire maximale ont un nombre de bases de 100 à 600; un acide polyinosinique.poly(acide cytidine-5'(-thiophosphorique) ayant une valeur de S de 4 à 13, de préférence ceux dont les molécules correspondant à la répartition moléculaire maximale ont un nombre de bases de 100 à 600, un poly (acide adénylique-acide uridylique) ayant une valeur de S de 4 à 13, de préférence ceux dont les molécules correspondant à la répartition moléculaire maximale ont un nombre de bases de 100 à 600; un acide polyinosinique. poly(acide cytidylique, acide uridylique) ayant une valeur de S de 4 à 13, de préférence ceux dont les molécules correspondant à la répartition moléculaire maximale ont un nombre de bases de 100 à 600; un acide polyinosinique.acide polycytidylique.poly-L-lysine ayant une valeur de S de 4 à 13, de préférence ceux dont les molécules correspondant au maximum de répartition des masses moléculaires ont un nombre de bases de 100 à 600; et un acide polyinosinique.poly(acide 1-vinylcytidylique) ayant une valeur de S de 4 à 13, de préférence ceux dont les molécules correspondant au maximum de la répartition moléculaire ont un nombre de bases de 100 à 600.

3. Composition anti-tumorale contenant comme ingrédient actif, le polymère d'acide nucléique à double brin suivant l'une des revendications 1 et 2.

CH 676 122 A5

4. Composition antivirale contenant comme ingrédient actif, le polymère d'acide nucléique à double brin selon l'une des revendications 1 et 2.

5. Composition anti-tumorale selon la revendication 3, qui contient en outre un ou plusieurs modificateurs de la réponse biologique et/ou cancérostatique.

5 6. Composition antivirale selon la revendication 4, qui contient en outre un ou plusieurs modificateurs de la réponse biologique et/ou cancérostatique.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

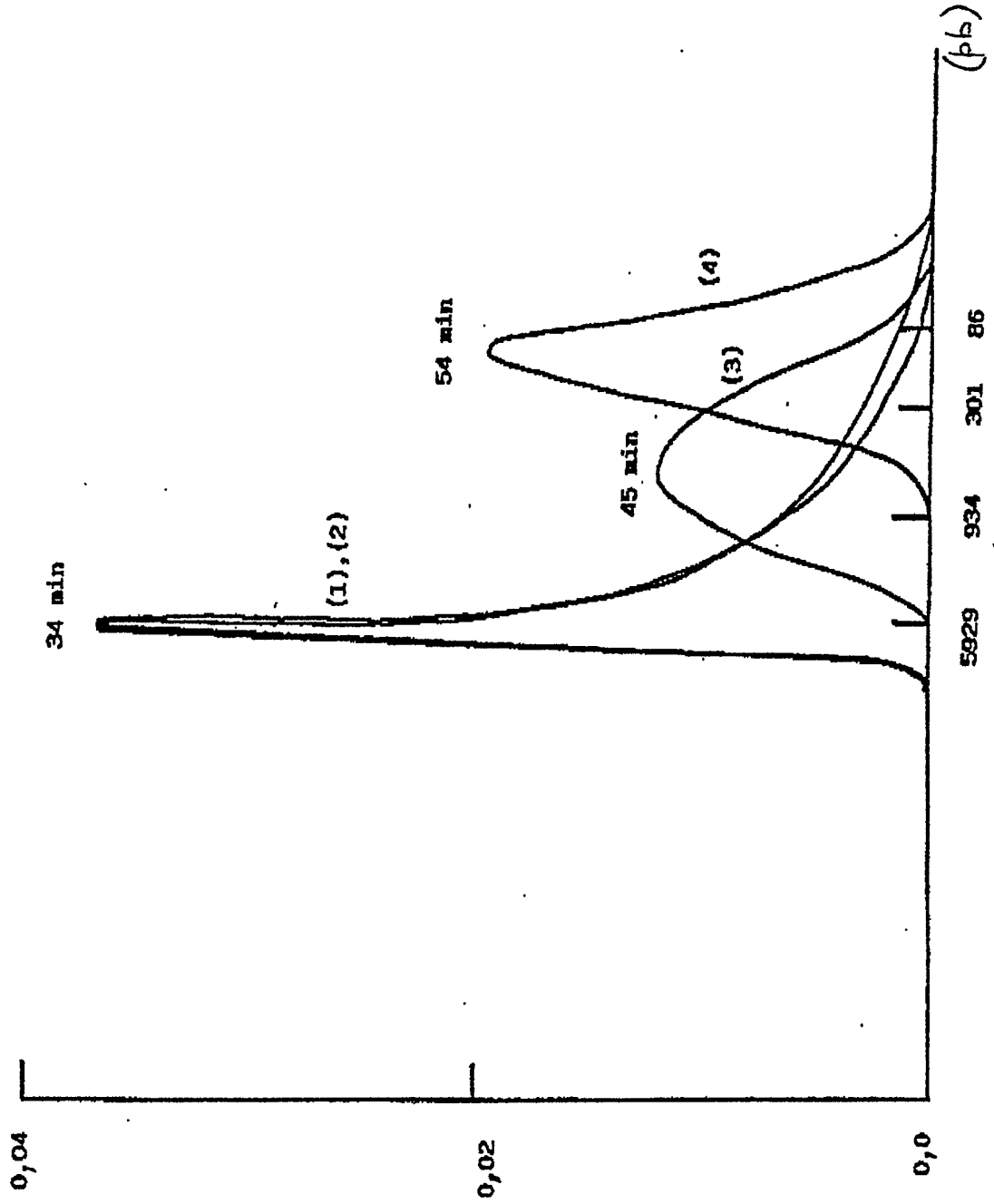


Fig. 1