

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 11 juillet 1985.

③0 Priorité : US, 12 juillet 1984, n° 630 013.

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 3 du 17 janvier 1986.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : *RIBI IMMUNOCHEM RESEARCH, INC.*
— US.

⑦2 Inventeur(s) : Edgar Ernst Ribi.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Cabinet Hirsch.

⑤4 Méthode d'inhibition de l'apparition d'un syndrome aigu d'irradiation, méthode d'inhibition de l'apparition d'une septicémie et composition à cet effet.

⑤7 La présente invention a pour objet une composition pour éviter l'apparition d'un syndrome aigu d'irradiation occasionné par l'exposition du corps entier d'animaux à sang chaud, à une dose d'au moins 100 rads de rayons X. L'invention a également pour objet une composition pour éviter l'apparition d'une septicémie. Cette composition contient une endotoxine détoxifiée raffinée en combinaison avec un véhicule ou un support pharmaceutiquement acceptable.

1

METHODE D'INHIBITION DE L'APPARITION D'UN SYNDROME AIGU D'IRRADIATION
ET METHODE D'INHIBITION DE L'APPARITION D'UNE SEPTICEMIE
ET COMPOSITION A CET EFFET

5 La présente invention a pour objet une méthode d'inhibition de
l'apparition d'un syndrome aigu d'irradiation occasionnée par l'exposi-
tion des animaux à sang chaud à une dose appliquée au corps entier d'au
moins 100 rads de rayons X. La présente invention a également pour objet
une méthode d'inhibition de l'apparition d'une septicémie. Chacune de
10 ces méthodes consiste à administrer à un animal à sang chaud une quan-
tité efficace d'une composition pharmaceutique contenant une endotoxine
détoxifiée et raffinée (RDE) en combinaison avec un support pharmaceuti-
quement acceptable.

 L'exposition du corps entier d'un animal à sang chaud à une dose
15 d'au moins environ 100 rads de rayonnement X conduit à l'apparition d'un
ensemble complexe de symptômes que l'on appelle syndrome aigu d'irradia-
tion. La nature et la sévérité du syndrome aigu d'irradiation sont
directement liées à la dose de rayonnement X auquel est exposé l'animal
à sang chaud. Cependant, on reconnaît généralement que le système
20 hématopoïétique qui est responsable de la production des cellules du
sang est le plus sévèrement endommagé.

 La conséquence la plus importante de la destruction du système
hématopoïétique faisant suite à une exposition à un niveau élevé de
radiation est que l'immunité antimicrobienne est sévèrement compromise
25 vis-à-vis à la fois des micro-organismes exogènes et des micro-
organismes endogènes. A la suite d'une irradiation par des niveaux
élevés de rayonnement X, tous les animaux à sang chaud, y compris
l'homme, sont plus sensibles à un large spectre de bactéries, de virus,
de protozoaires, etc., et ceci est discuté dans "Beneficial Effects of
30 Endotoxins", de Alois Nowatny, pages 127-148, Plenum Press, 1983.

Pour combattre l'effet toxique des rayons X, il est nécessaire de stimuler la production et la différenciation des granulocytes (granulopoïèse). Les granulocytes sont des globules blancs du sang tels que des macrophages, des monocytes, des éosinophiles et des basophiles. On
5 sait que le sang contient un facteur connu sous le nom de facteur de stimulation de colonies (CSF) qui est nécessaire à la granulopoïèse. Le facteur de stimulation de colonies est décrit par Chervenick P.A. et coll., Science 118, 164, 1972; et par Golde D.W. et coll., Lancet 2, 1397, 1972, incorporés ici à titre de référence. Cependant, le degré
10 auquel le sang présente un facteur de stimulation de colonies est directement corrélé à la capacité du corps à résister à des doses de radiation élevées.

La septicémie est un syndrome clinique dans lequel l'infection se dissémine à travers le corps par le courant sanguin. C'est une infection
15 du sang potentiellement désastreuse qui peut être occasionnée par toute une série de bactéries. C'est un état pathologique qui résulte de la présence de micro-organismes et/ou de leurs sous-produits toxiques dans le courant sanguin.

Une étude datée de 1974 indique que la septicémie frappe 71 000 personnes chaque année aux Etats-Unis, ces attaques étant suivies de mort
20 dans environ 25% des cas. Une des causes majeures de septicémie résulte d'infections post-opératoires occasionnées par des bactéries endogènes existant dans le système respiratoire ou l'appareil digestif (voir Cruse, P.J.E., et coll., Arch., Surg. 107, 106-210, 1973), incorporé ici
25 à titre de référence.

Une endotoxine détoxifiée raffinée (RDE) se caractérise en ce qu'elle ne contient pas de 2-céto-3-désoxyoctanoate détectable, elle contient entre 350 et 475 nmoles/mg de phosphore et entre environ 1 700 et 2 000 nmoles/mg d'acides gras. La RDE représente une amélioration
30 significative sur les extraits endotoxiques que l'on obtient à partir des entérobactériacées parce que la RDE est détoxifiée et ne contient donc pas les composants extrêmement toxiques qui ont rendu les extraits endotoxiques impropres à l'utilisation thérapeutique (voir Peptides as Requirements for Immunotherapy of the Guinea-Pig Line-10 Tumor with
35 Endotoxins; Ribí et coll., Cancer Immunol. Immunother, Vol. 7, pages 43-58, 1979) incorporé ici à titre de référence. Les effets bénéfiques de la RDE par rapport aux autres extraits endotoxiques sont par exemple décrits dans les brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 4 436 727

et 4 436 728; et dans Ribí E. Journal of Biological Response Modifiers 3/1-9, Raven Press, (1984) inclus ici à titre de référence.

Le but de la présente invention est donc de procurer un procédé d'inhibition de l'apparition du syndrome aigu d'irradiation chez les
5 animaux à sang chaud dont le corps entier est exposé à une dose d'au moins 100 rads de rayons X par utilisation d'une composition thérapeutique qui contient une endotoxine détoxifiée raffinée.

Un autre but de la présente invention est de procurer une méthode d'inhibition de l'apparition d'une septicémie chez les animaux à sang
10 chaud par utilisation d'une composition thérapeutique qui contient une endotoxine détoxifiée raffinée.

La présente invention a pour objet une méthode d'inhibition de l'apparition du syndrome aigu d'irradiation chez un animal à sang chaud, syndrome qui apparaît à la suite de l'exposition de tout le corps de
15 l'animal à sang chaud à une dose d'au moins 100 rads de rayons X, qui consiste à administrer à l'animal à sang chaud, avant son exposition à cette dose de rayonnement X, une dose efficace d'une composition qui contient une endotoxine détoxifiée raffinée et un véhicule pharmaceutiquement acceptable. La présente invention a également pour objet une
20 méthode d'inhibition de l'apparition d'une septicémie chez les animaux à sang chaud qui consiste à administrer à ces animaux à sang chaud une dose efficace d'une composition contenant une endotoxine détoxifiée raffinée et un support pharmaceutiquement acceptable.

L'endotoxine détoxifiée raffinée employée dans la présente invention peut se préparer de la manière exposée dans les brevets des
25 Etats-Unis d'Amérique n° 4 436 727 et 4 436 728 incorporés ici à titre de référence. Plus spécifiquement, les extraits d'endotoxine du type utilisé comme matière première pour produire la RDE peut s'obtenir à partir de n'importe quelles entérobactériacées y compris des organismes
30 apparentés et des mutants. Les brevets ci-dessus décrivent le type de micro-organismes que l'on peut utiliser pour obtenir la matière première et plusieurs méthodes de préparation de la matière première. La méthode d'obtention de l'extrait endotoxique que l'on préfère est celle décrite par Chen et coll., J. Infect. Dis 128 543 (1973).

35 La RDE telle que préparée ci-dessus est associée à un véhicule pharmaceutiquement acceptable tel que par exemple une solution saline tampon à base de phosphate que l'on peut injecter par voie parentérale (par exemple intraveineuse, intrapéritonéale ou intramusculaire). La

composition selon l'invention contient d'environ 1 à 1 000 microgrammes de RDE, de préférence d'environ 25 à 200 microgrammes, lorsqu'il s'agit par exemple de l'administration à un patient adulte type de 70 kg. On peut administrer la composition au patient une, deux ou trois fois par

5 semaine et le nombre d'administrations est habituellement d'environ deux ou trois fois.

La composition contenant de la RDE, lorsqu'on l'utilise pour inhiber l'apparition du syndrome aigu d'irradiation, doit être administrée au moins 24 heures avant que l'animal à sang chaud soit exposé à la

10 dose élevée de radiation d'au moins 100 rads, de préférence entre environ 24 et 48 heures.

EXEMPLE 1

Essai d'induction du facteur de stimulation de colonies (CSF) in vivo.

A trois groupes de souris NMRI (chaque groupe contenant 5 souris),

15 on injecte par voie intraveineuse 5 microgrammes de la substance à tester identifiée dans le tableau 1.

TABLEAU 1

20	Substance	Colonies (X + divergence standard) *
	Endotoxine déttoxifiée raffinée de S.minnesota R595	80 ± 3,6
	Endotoxine déttoxifiée raffinée	
25	S. Typhimurium G30/C21	72 ± 9,3
	Référence saline	0

* moyenne arithmétique.

On prélève du sang dans le plexus orbital deux heures après

30 l'injection et on fait ensuite un essai en triple pour déterminer la teneur en CSF. La méthode d'essai est décrite dans Metcalf D. et Moore M.A., dans Haemopoetic Cells, North Holland Publishing Company, Amsterdam, Holland, 1971. La teneur en CSF est exprimée en nombre de colonies dans 10^5 cellules de moelle osseuse nucléées/ml. Comme indiqué

35 dans le tableau 1, les deux groupes de souris auxquels on a injecté de la RDE présentent une activité CSF significative tandis que le groupe de référence auquel on a injecté qu'une solution saline ne présente pas d'activité CSF. Le test précédent établit que la RDE stimule la

production de CSF, ce qui est nécessaire à la production et à la différenciation des granulocytes (granulopoïèse).

EXEMPLE 2

Protection contre les rayons X.

- 5 A deux groupes de souris C3HeB/FeJ (chaque groupe étant composé de 20 souris), on injecte chaque fois par voie intraveineuse la substance à essayer représentée sur le tableau 2. On injecte les souris 24 heures avant l'irradiation par 600 rads de rayons X au taux de 70 rads par minute. Sur un troisième groupe de 20 souris (référence), on n'injecte pas de substance à tester et on les expose aux rayonnements de la même façon que les deux groupes de souris mentionnés ci-dessus.

- 10 Comme noté dans Nowatny A. page 127, le maximum d'incidence de mortalité pour une demi-dose létale de rayons X se produit entre 10 et 14 jours à la suite de l'irradiation. Par conséquent, on s'attend à ce que, à la fois les animaux de référence et ceux traités par la RDE avant l'exposition, survivent les dix premiers jours après l'exposition au niveau élevé de rayonnements décrit ci-dessus. Après 15 jours, 85% des animaux traités à la RDE survivent à l'exposition tandis que seulement 50% des animaux de référence survivent. 20 jours à la suite de l'exposition, de 70 à 75% des souris traitées à la RDE restent vivantes tandis que seuls 25% des animaux de référence survivent. Par conséquent, la RDE est un facteur significatif de réduction du risque de mort après exposition à des niveaux élevés de radiation.

TABLEAU 2

25	Préparation	Dose (µg)	Nombre d'animaux	Pourcentage de survivants au jour			
				10	15	20	30
30	Référence	-	20	100	55	25	20
	RDE-S.minnesota	100	20	100	85	75	75
	RDE-S.typhimurium	100	20	100	85	70	65

EXEMPLE 3

- 35 Protection contre l'apparition d'une septicémie.

On effectue un prétraitement de 14 souris NMRI par 1 microgramme de RDE administré par injection intrapéritonéale. 14 jours plus tard, on fait subir à chacune des souris une opération chirurgicale dans laquelle

- on ligature le caecum de chaque souris et on le ponctionne pour exposer l'intérieur des souris à des micro-organismes capables de provoquer l'apparition d'une septicémie. Après achèvement de l'opération chirurgicale, on observe les animaux pendant 120 heures. Un deuxième groupe de 5 souris est soumis à une opération chirurgicale précisément de la même façon mais sans prétraitement à la RDE. Les résultats sont indiqués sur le tableau 3. 71% des souris traitées à la RDE survivent 120 heures après induction de la septicémie. Celles qui n'ont pas reçu de traitement par la RDE ne présentent qu'un taux de survie de 21%.
- 10 Les résultats précédents montrent que la RDE inhibent l'apparition d'une septicémie.

TABLEAU 3

15	RESISTANCE NON SPECIFIQUE A UNE SEPTICEMIE INDUITE CHEZ LA SOURIS PAR LIGATURE ET PONCTIONNEMENT DU CAECUM		
		120 heures après induction de la septicémie	
20	<u>Prétraitement</u>		
	1 µg, i.p., 24 heures avant l'opération chirurgicale	Morts/total	% de survie
	Aucun	11/14	21
25	RDE (S.typhimurium)	4/14	71

30

35

REVENDEICATIONS

1.- Composition permettant

- 5 (1) d'inhiber l'apparition d'un syndrome aigu d'irradiation chez un animal à sang chaud, ce syndrome étant occasionné par l'exposition du corps entier de l'animal à sang chaud à une dose d'au moins 100 rads de rayons X; et
- (2) d'inhiber l'apparition de la septicémie chez un animal à sang chaud;

cette composition contenant :

- 10 (a) une dose efficace d'une endotoxine détoxifiée raffinée ne contenant pas de 2-céto-3-désoxyoctanoate détectable, et contenant entre environ 350 et 475 nmoles/mg de phosphore et entre environ 1 700 et 2 000 nmoles/mg d'acides gras et
- 15 (b) un support pharmaceutiquement acceptable
- 2.- Composition pour éviter l'apparition d'un syndrome aigu d'irradiation chez un animal à sang chaud occasionné par l'exposition du corps entier de l'animal à une dose d'au moins 100 rads de rayons X, contenant:
- 20 a) une dose pharmaceutiquement acceptable d'une endotoxine détoxifiée raffinée ne contenant pas de 2-céto-3-désoxyoctanoate détectable, et contenant entre environ 350 et 475 nmoles/mg de phosphore et entre environ 1 700 et 2 000 nmoles/mg d'acides gras; et
- b) un support pharmaceutiquement acceptable.

- 25 3.- Composition pour éviter l'apparition d'une septicémie chez les animaux à sang chaud contenant:

- a) une dose pharmaceutiquement acceptable d'une endotoxine détoxifiée raffinée ne contenant pas de 2-céto-3-désoxyoctanoate détectable, et contenant entre environ 350 et 475 nmoles/mg de phosphore et
- 30 entre environ 1 700 et 2 000 nmoles/mg d'acides gras; et
- b) un support pharmaceutiquement acceptable.

4.- Composition selon une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle se trouve sous la forme d'une solution saline tampon à base de phosphate.

- 35 5.- Composition selon une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle est administrée par voie parentérale.

6.- Composition selon une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que cette quantité efficace de la composition est

comprise entre environ 1 et 1 000 μg .

7.- Composition selon la revendication 6, caractérisée en ce que cette quantité efficace de la composition est comprise entre environ 25 et 200 μg .

5

10

15

20

25

30

35