(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) **N° de publication :** **2 861 994**

(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) **N° d'enregistrement national :** **03 13224**

(51) Int Cl[7] : **A 61 K 49/06,** A 61 P 35/00, 29/00, 9/00

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt :** 12.11.03.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 13.05.05 Bulletin 05/19.

(56) **Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire :** *Se reporter à la fin du présent fascicule*

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

(71) **Demandeur(s) :** *GUERBET SA Société anonyme* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** GUILBERT IRENE.

(73) **Titulaire(s) :**

(74) **Mandataire(s) :** REGIMBEAU.

(54) NOUVEL AGENT DE DIAGNOSTIC POUR L'IRM DANS LES PATHOLOGIES IMPLIQUANT DES PROTEINASES.

(57) La présente invention concerne l'utilisation de particules d'oxyde métallique magnétique recouvertes d'un revêtement dépourvu de composé de ciblage spécifique de MMP, dans la préparation d'un agent de diagnostic par IRM d'une pathologie impliquant au moins une MMP.

FR 2 861 994 - A1

L'invention concerne l'utilisation diagnostique ou thérapeutique de particules d'oxyde métallique magnétique, recouvertes de molécules monomériques, oligomériques ou polymériques, pour les maladies impliquant des métalloprotéinases de la matrice ou matrixines (MMP).

L'imagerie des pathologies où sont impliquées les MMP constitue un enjeu majeur en terme de diagnostic et de thérapeutique. Ces pathologies incluent notamment les maladies cardio-vasculaires (lésions athéroscléreuses), les maladies inflammatoires (telles que la polyarthrite rhumatoïde, les scléroses multiples, etc.), les cancers (tumeurs et métastases).

On sait que les MMP sont des enzymes de la famille des endopeptidases zinc-dépendantes, qui possèdent la propriété de dégrader les membranes basales et les tissus conjonctifs et qui participent à l'homéostase de la matrice extracellulaire. Cette matrice extracellulaire entourant les cellules est constituée de glycosaminoglycanes ainsi que de protéines de structure comme le collagène et l'élastine et de protéines d'adhésion comme la fibronectine et la laminine. Les MMP ont été classées en 5 groupes : les Gélatinases (Collagènases type IV, MMP-2 et –9), les Stromelysines (MMP-3, -10 et –11), les Collagénases (MMP-1, -8, -13 et –18) , les Matrilysines (MMP-7 et -26) ainsi que le groupe des MT-MMP (« membrane-type » MMP).

Les MMP sont surexprimées dans les plaques d'athérome actives, un niveau d'expression élevé étant corrélé à un risque de rupture accru de ces plaques. Plusieurs études indiquent que les MMP sont impliquées dans le remodelage de la matrice extra-cellulaire au niveau de la plaque : au moins huit MMP y sont surexprimées, et de nouvelles MMP sont régulièrement identifiées:

Enzyme	MMP
Collagénase interstitielle	MMP-1
Gélatinase A	MMP-2
Gélatinase B	MMP-9
Stromélysine-1	MMP-3
Matrilysine	MMP-7
Elastase macrophagique	MMP-12
Collagénase-3	MMP-13
MMP-membranaire MT-MMP-1	MMP-14

Les MMP1 et 3 sont notamment décrites dans Johnson J et al. Activation of matrix-degrading metalloproteinases by mast cell proteases in atherosclerotic plaques (Arterioscl Thromb Vasc Biol 1998; 18: 1707-1715).

Les MMP sont également impliquées dans les pathologies cancéreuses, avec principalement deux fonctions distinctes :

a) elles participent à la dissémination tumorale en détruisant la matrice extra-cellulaire ;

b) elles créent un environnement qui favorise la croissance et l'angiogénèse des tumeurs primaires et métastasées.

Les MMP exprimées dans les principales tumeurs humaines sont notamment et de façon non exhaustive les suivantes :

- cancer du sein : MMP-1,2,3,7,9,11,13,14
- cancer colo-rectal : MMP-1,2,3,7,9,11
- cancer du poumon : MMP- 2,3,7,9,11,14
- cancer de la prostate : MMP-1,2,3,7,9.

Et il y a une corrélation fréquente entre le stade de progression tumorale et le niveau d'expression des MMP. En général, les tumeurs malignes expriment une plus grande quantité de MMP que les tumeurs bénignes.

Les MMP sont également impliquées dans les pathologies associées à des réactions inflammatoires comme les arthrites et les néphrites, ou des maladies dégénératives comme par exemple les ulcérations de la peau, de la cornée, de

l'estomac, les scléroses multiples, la maladie d'Alzheimer, les cirrhoses du foie, les fibroses des poumons, les problèmes d'infertilité, etc. (catalogue BACHEM 2002). Plusieurs études indiquent que les MMP interviennent dans les différentes phases du développement des lésions de la Sclérose en Plaques. Ainsi, les cellules résidentes du SNC (cellules endothéliales, astrocytes, microglie) et les cellules immunitaires (lymphocytes, macrophages) sécrètent des MMP qui permettent l'ouverture de la BHE. Une production accrue de MMP-1, -2, -3, -7 et -9 a été rapportée au centre et à la périphérie des plaques dans les cerveaux de patients décédés.

On connaît déjà des produits de contraste destinés au diagnostic de pathologies impliquant des MMP. Ces produits sont utilisés en Médecine Nucléaire ou en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). L'IRM permet la visualisation d'organes internes chez des êtres vivants et constitue donc un auxiliaire et un guide puissant dans le diagnostic, le traitement médical et la chirurgie.

Ces produits de contraste sont appelés des produits spécifiques car ils ciblent de manière spécifique des marqueurs associés à des pathologies, en l'occurrence des MMP. Le ciblage spécifique de MMP est obtenu dans l'art antérieur à l'aide de biovecteurs moléculaires destinés spécifiquement au ciblage de MMP, tels que des peptides ou d'autres molécules connus de l'art antérieur comme ayant une affinité spécifique pour au moins une MMP.

On connaît d'une part des produits spécifiques à base de chélates, capables de se lier à un ion de métal paramagnétique tel que le Gadolinium ou à un radioisotope. Le chélate est une molécule linéaire (telle que le DTPA) ou macrocyclique (telle que le DOTA) couplée à un biovecteur ligand de ciblage des MMP (document WO 01/60416).

On connaît d'autre part des produits spécifiques à base de particules d'oxyde de fer recouvertes à leur surface de biovecteurs de ciblage spécifique d'une pathologie. Par exemple le brevet US 6 576 221 décrit comme biovecteur un peptide ligand du récepteur à l'endothéline. Ces particules, désignées selon leur taille SPIO (small particles of iron oxide) ou USPIO (ultra small particles of iron oxide), comprennent un cœur à base d'oxyde de fer, sur lequel est greffé le biovecteur.

Dans la suite de la description on utilisera indifféremment les termes SPIO et USPIO, l'invention recouvrant l'utilisation de ces particules à base d'oxyde de fer en imagerie chez l'homme.

On rappelle que l'effet de contraste peut être accentué par la présence, dans l'environnement des organes soumis à examen, de diverses espèces magnétiques, par exemple paramagnétiques, ferromagnétiques ou super-paramagnétiques. Les substances paramagnétiques comprennent certains métaux comme le fer, le manganèse, le gadolinium à l'état ionique ou organométallique. Les substances de contraste ferromagnétiques comprennent généralement des particules d'agrégat magnétiques de taille micrométrique ou sous-micrométrique, c'est-à-dire non inférieure à 500 nm, par exemple des particules de ferrites, dont notamment de magnétite (Fe_3O_4), de maghémite (γ-Fe_2O_3) et autres composés minéraux magnétiques d'éléments de transition. Les particules super-paramagnétiques sont habituellement de très petites particules de ferrite, dont notamment de magnétite (Fe_3O_4), de maghémite (γ-Fe_2O_3) et autres composés minéraux magnétiques d'éléments de transition, de taille inférieure à environ 100-150 nm. Contrairement aux particules ferromagnétiques, les particules superparamagnétiques ne se comportent plus comme de petits aimants autonomes du fait que leur taille est inférieure à une valeur critique, c'est-à-dire qu'elles s'alignent dans une direction préférentielle uniquement lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique externe. Les particules superparamagnétiques présentent avantageusement une densité d'efficacité plus élevée par rapport aux particules ferromagnétiques.

Le demandeur a découvert, de manière totalement inattendue, que des produits à base de particules d'oxydes de fer recouvertes d'un revêtement, en principe non spécifiques car les particules ne sont pas recouvertes d'un biovecteur de ciblage des MMP, sont efficaces dans le ciblage de MMP, et ainsi dans le diagnostic spécifique de maladies impliquant des MMP. Les particules d'oxyde magnétique de fer préparées sont capables de reconnaître spécifiquement les MMP, alors qu'elles ne possèdent pas de ligand ciblant les MMP greffé à leur surface.

Cette nouvelle utilisation d'USPIO et/ou de SPIO ne comprenant pas de partie de ciblage spécifique est très avantageuse pour le diagnostic et le traitement de

pathologies spécifiques, notamment pour des raisons de coût et/ou de toxicité nettement réduits du produit.

L'invention concerne ainsi selon un premier aspect l'utilisation de particules d'oxyde métallique magnétique recouvertes d'un revêtement dépourvu de composé de ciblage spécifique de MMP, pour la préparation d'un agent de diagnostic par IRM d'une pathologie impliquant au moins une MMP. L'invention concerne une méthode de diagnostic par IRM d'une pathologie impliquant au moins une MMP, comprenant l'administration d'une particule recouverte d'un revêtement dépourvu de composé de ciblage spécifique de MMP, et la détection de la modification du signal en IRM.

Par l'expression pathologie impliquant au moins une MMP, on désigne une pathologie où une ou plusieurs MMP ont un niveau d'expression différent dans la zone pathologique par rapport au niveau d'expression dans une zone saine. Le niveau d'expression d'une MMP peut être dû à une quantité accrue de MMP produite et/ou au niveau d'activation de la MMP produite (rapport zymogène versus enzyme activée).

Selon un mode de réalisation la pathologie est une maladie due à la présence de plaques d'athérome.

Selon un mode de réalisation la pathologie est un cancer.

Selon un mode de réalisation la pathologie est une maladie inflammatoire ou dégénérative. Selon un mode de réalisation la pathologie est une maladie faisant intervenir un mécanisme réactionnel inflammatoire.

Les particules d'oxyde de fer sont recouvertes d'un revêtement de préférence de type polysaccharide choisi parmi les dextrans ou dérivés. Les dérivés de dextrans peuvent contenir au moins un groupe acide, ou plusieurs groupes fonctionnels comprenant des atomes O, N, S, P. On pourra notamment utiliser des carboxy ou polycarboxy dextrans. Les dérivés carboxyliques de polysaccharides sont par exemple le dérivé carboxyméthylique (la particule est recouverte de carboxyméthyldextran le cas échéant réduit), carboxyéthylique, carboxypropylique. Ce revêtement des particules magnétiques est destiné à obtenir une stabilité des solutions colloïdales de particules magnétiques, encore dénommées ferrofluides, en milieu physiologique. Les synthèses permettant

d'aboutir à ce type de particules sont connues, par exemple décrites dans Robert S. Molday and D. Mackenzie ; *J. of Immunological Methods* (1982), 52, p 353-367) ou Chem.Commun 2003,927-937. De telles particules recouvertes sont décrites par exemple dans les documents EP 656 368, WO 98/05430, EP 450 092 (dans ce document le dérivé carboxylique est contenu en une quantité de 0.05 à 10 parties en poids par partie en poids du métal de l'oxyde métallique magnétique ; le dérivé carboxyalkylique utilisé pour la fabrication de la particule a une viscosité intrinsèque comprise entre 0.02 et 0.5 dl/g , de préférence 0.05 à 0.3dl/g).

Parmi les particules utilisables, recouvertes d'un revêtement de dérivés polymériques ou non polymériques, on préfèrera des USPIO actuellement en phase clinique dont le SINEREM, le 7228, le SHU 555A (RESOVIST, revêtement à base de carboxydextran, décrit notamment dans Radiology,2001,vol 221,237-243), le SHU555C (SUPRAVIST), le NC100150 (revêtement d'amidon décrit notamment dans Magn.Res.Mat in Physics, Biology and Medicine,1999,8:207-213), le VSOP (revêtement à base de citrate décrit notamment dans Prog Colloid Polym Sci,1996,100:212-216, et Journ.magn.res.imag,2000,12:905-911, EP 888 545), les particules de type MION et CLIO, les ADMS, ainsi que les dérivés perfectionnés de ces différents composés encore au stade pré-clinique. Le SINEREM et plusieurs procédés de synthèse du SINEREM sont décrits dans les brevets EP B 441 797, EP B 517 740, EP B 514 493. Dans le cas du composé 7228 (EP 1 169 062), le cœur est couvert d'un dérivé carboxylique de polysaccharide hydrosoluble neutre, ce qui lui confère des caractéristiques avantageuses notamment de faible toxicité, le produit pouvant ainsi être administré en bolus.

On pourra aussi utiliser comme revêtement des macromolécules telles que des protéines comme l'albumine ou des polymères de synthèse comme les méthacrylates et les organosilanes, des galactanes [Josephson L., Groman E. V., Menz E. et al; Magnetic Resonance Imaging 8; 616-637; 1990], de l'amidon [Fahlvik A. K., Holtz E., Schroder U. et al; Invest. Radiol. 25; 793-797; 1990], des glycosaminoglycanes [Pfefferer D, Schimpfky C., Lawaczeck R.; SMRM--Book of abstracts 773; 1993]. On pourra aussi utiliser comme revêtement des branches PEG et aminoalcool.

Grâce à l'enseignement de la présente demande, l'homme du métier pourra sélectionner des revêtements appropriés à l'aide de tests de mesure de l'activité inhibitrice de MMP décrite dans les exemples plus loin.

Les particules non recouvertes (ferrofluides "acides" ou "alcalins") ont largement été décrites dans la littérature, notamment dans la publication Massart et al., C. R. Acad. Sc. Paris, t. 291, 7/07/1980, Série C et IEE, *Transactions on Magnetics*, 1981, vol. MAG-17,n°2, p. 1247).

L'invention concerne selon un autre aspect l'utilisation de particules d'oxyde métallique magnétique recouvertes, mais dépourvues de ligand de ciblage spécifique des MMP, pour la préparation d'un agent thérapeutique d'une pathologie impliquant au moins une MMP (et une méthode de traitement thérapeutique comprenant l'administration à des patients de ces particules). On connaît un grand nombre d'agents destinés au traitement thérapeutique de maladies impliquant des MMP, en particulier des agents comprenant des inhibiteurs de MMP abondamment décrits dans l'art antérieur, par exemple dans Current Medicinal Chemistry, 2001, 8, 425-474 ; Chem.Rev, 1999, 99, 2735-2776. Certains agents possèdent une faible efficacité thérapeutique, en raison de leur dégradation prématurée, avant même d'avoir pu atteindre leur cible. On a dans l'art antérieur recherché à associer de tels inhibiteurs à des substances protectrices (introduction dans une matrice de dextran par exemple) mais ces agents perdent alors leur efficacité thérapeutique (biodistribution défavorable, libération de l'inhibiteur inadéquate). Or, les résultats des études de biodistribution et d'imagerie in vivo et ex vivo, avec du Sinerem notamment, démontrent que les particules de fer recouvertes de revêtements hydrophiles parviennent à un niveau suffisamment élevé jusqu'au site biologique où sont surexprimées les MMP, par exemple dans les plaques d'athérome. Les particules administrées à une dose appropriée pour assurer une bonne tolérance, permettront ainsi un traitement au moins partiel de la pathologie. On peut de plus utiliser les propriétés r1 et r2 des USPIO pour obtenir des images en double contraste (Ruehm, Corot, Circulation).

On décrit maintenant plus précisément les particules utilisées. Par "particules à base d'un composé du fer", on entend, au sens de la présente description, des

particules constituées en tout ou partie par un dérivé du fer, comprenant généralement du fer (III), généralement un oxyde ou un hydroxyde de fer. Les particules magnétiques sont composées typiquement en tout ou partie d'hydroxyde de fer ; d'oxyde de fer hydraté ; de ferrites ; d'oxydes de fer mixtes tels que des oxydes de fer mixtes de cobalt, de nickel, de manganèse, de béryllium, de magnésium, de calcium, de baryum, de strontium, de cuivre, de zinc ou de platine ; ou d'un mélange de ceux-ci. Au sens de la présente invention, le terme de "ferrite" désigne les oxydes de fer de formule générale [x Fe_2O_3, y MO_z], où M désigne un métal magnétisable sous l'effet d'un champ magnétique tel que Fe, Co, Ru, Mg, Mn, le métal magnétisable pouvant être éventuellement radioactif. De façon préférentielle, les particules magnétiques des compositions de l'invention comprennent une ferrite, notamment la maghémite (γ Fe_2O_3) et la magnétite (Fe_3O_4), ou encore les ferrites mixtes de cobalt (Fe_2CoO_4) ou de manganèse (Fe_2MnO_4).

Le diamètre hydrodynamique de la structure de base des USPIO/SPIO utilisées (coeur d'oxyde de fer recouvert) en solution est typiquement compris entre 5 et 500 nm, de préférence 5 à 50 nm.

L'intensité d'aimantation de l'oxyde métallique est typiquement comprise entre 1 et 150 u.em pour 1 g de métal dans un champ magnétique de 1 tesla à 20°C, de préférence de 50 à 100.

Les relaxivités r_1 et r_2 d'un produit de contraste magnétique donnent la mesure de son efficacité magnétique et permettent d'apprécier son influence sur le signal enregistré. Les composés obtenus présentent des relaxivités r_1 et r_2 avantageuses, permettant d'obtenir une forte augmentation des vitesses de relaxation des protons (R_1 = 1/T1 et R_2 = 1/T2). Cet effet sur les vitesses de relaxation permet alors d'obtenir un bon contraste en IRM, dans les zones ciblées. La relaxivité r1 est de l'ordre de 10 à 50 mMol-1s-1 et la relaxivité r2 de l'ordre de 20 à 400 mMol-1s-1, à 20 MHz.

La teneur en fer de la particule (% en poids) est de l'ordre de 20 à 60%, typiquement de 30 à 50%.

Les USPIO/SPIO sont typiquement utilisées à une dose de 0.1µmol/kg à 10 mmol/kg en métal, de préférence de 1µmol/kg à 5 mmol/kg, notamment de l'ordre de la mmol, par injection ou perfusion dans une artère ou une veine.

Les USPIO/SPIO sont typiquement sous forme de solutions colloïdales stables (ou de suspensions de particules stabilisées) et peuvent être formulées sous forme de poudres lyophilisées à associer à un solvant approprié. Leur voie d'administration est connue de l'homme du métier, typiquement intraveineuse, mais aussi en application locale (carcinome mammaire par exemple).

Les compositions de l'invention sont préférablement administrées par voie parentérale, par voie orale, les autres voies d'administration n'étant cependant pas exclues, l'administration sous forme d'une injection intraveineuse étant particulièrement préférée.

Lorsque l'administration par voie orale est envisagée, les compositions de l'invention se trouvent par exemple sous la forme de gélules, comprimés effervescents, comprimés nus ou enrobés, sachets, dragées, ampoules ou solutés buvables, microgranules ou formes à libération prolongée ou contrôlée. Des produits à administration orale sont connus comme le Lumirem.

Lorsque l'administration par voie parentérale est envisagée, les compositions de l'invention se trouvent par exemple sous la forme de lyophilisats prêts à être reconstitués ou de solutés et suspensions injectables conditionnées en ampoules ou flacons ou seringues pré-remplies, pour perfusion veineuse lente ou injection intra-veineuse en bolus.

Les formes pour l'administration orale sont préparées par mélange des particules magnétiques avec différents types d'excipients ou de véhicules tels que des charges, des agents de délitement, des liants, des colorants, des agents correcteurs de goût et analogues, et puis, mise en forme du mélange en une gélule à libération contrôlée notamment.

La solubilité aqueuse et la faible osmolalité des particules de l'invention permettent de préparer des solutions aqueuses isotoniques, de forte concentration et de viscosité acceptable pour l'injection.

Les formes pour l'administration parentérale sont obtenues de façon conventionnelle par mélange des particules magnétiques avec des tampons, des

agents stabilisants, des conservateur, des agents solubilisants, des agents isotoniques et des agents de mise en suspension. Conformément aux techniques connues, ces mélanges sont ensuite stérilisés puis conditionnés sous la forme d'injections intraveineuses ou de lyophilisats prêts à être reconstitués dans un véhicule stérile pharmaceutiquement acceptable.

Les doses unitaires seront fonction de la composition des particules magnétiques, de la voie d'administration, du type de diagnostic à établir, ainsi que du patient. Les doses unitaires seront en général de 1-10 mmol de fer pour un homme de taille moyenne (75 kg) Parmi les adjuvants pharmaceutiques on pourra citer des agents conservateurs, stabilisateurs de pH, des antioxydants.

On pourra en outre éventuellement, afin d'accroître encore l'effet des particules dépourvues de biovecteurs, administrer des agents thérapeutiques destinés au traitement de pathologies associées aux MMP, notamment des agents réduisant les plaques d'athérome, des anticancéreux, des agents anti-inflammatoires. Un grand nombre d'inhibiteurs de MMP sont connus. On pourra en outre augmenter l'effet thérapeutique par utilisation de rayonnement pour tuer par hyperthermie les éléments ciblées. Les particules pourront aussi être utilisées en radiothérapie en utilisant par exemple l'isotope Fe55.

Dans la mesure où la reconnaissance spécifique des MMP est susceptible d'être due au moins en partie à l'effet colloïdal des particules et/ou à leurs charges négatives, l'invention couvre aussi l'utilisation diagnostique et/ou thérapeutique de particules colloïdales non à base d'oxydes métalliques, recouvertes de molécules hydrophiles, avec ou sans principe actif dans le cœur de la particule, la taille de la particule étant appropriée pour obtenir une reconnaissance spécifique et ainsi un effet diagnostique et/ou thérapeutique.

Parmi les indications particulièrement intéressantes des particules USPIO/SPIO décrites par le demandeur dans la demande, on citera notamment l'identification de plaques actives dans des indications suivantes :

- sténoses des carotides symptomatiques comprises entre 50 et 70% de réduction du diamètre, pour lesquelles il est important d'obtenir d'autres critères de décision thérapeutique que le seul degré de sténose

- sténoses asymptomatiques de plus de 70% pour lesquelles le choix thérapeutique n'est pas clairement défini
- accidents ischémiques transitoires où il est important de connaître très rapidement la lésion responsable avant intervention chirurgicale.

La caractérisation des plaques inflammatoires à l'aide des particules sera aussi très utile pour analyser l'aorte thoracique, les anévrysmes de l'aorte abdominale, les anévrysmes intracrâniens, des pathologies neurovasculaires en prévention primaire ou secondaire, les ischémies cérébrales.

L'invention couvre également en outre :

- un kit de diagnostic par marquage des MMP-1 et MMP-3 au moyen d'USPIO/SPIO, à une concentration de 10^{-3} M en fer, la révélation des enzymes pouvant se faire par différentes techniques : histochimie (coloration de Perl's, marquage du fer), IRM, microscopie électronique, relaxométrie notamment.
- un procédé d'isolement et/ou de récupération des MMP utilisant des particules telles que décrites précédemment.

Par ailleurs d'autres enzymes retrouvées dans des zones pathologiques, notamment des enzymes ayant des analogies structurales et/ou fonctionnelles avec les MMP, sont susceptibles d'être également reconnues spécifiquement par les particules recouvertes d'un revêtement et dépourvues de biovecteur de ciblage spécifique citées dans la demande.

D'autres objets et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture de la description détaillée ci-après.

Des résultats significatifs ont été obtenus avec notamment le SINEREM et le 7228.

On rappelle que le SINEREM est un USPIO composé d'un cristal d'oxyde de fer (magnétite), recouvert de dextran T-10. Il possède les caractéristiques physico-chimiques suivantes :

- diamètre moyen de la particule : aux environs de 26,8 nm (mesuré par diffusion quasi-élastique de la lumière)
- diamètre moyen du cristal de fer : de l'ordre de 4,9 – 5,85 nm (en fonction de la technique de mesure : diffraction des rayons X ou microscopie électronique à transmission).

- rapport moyen dextran T-10 / Fer : de l'ordre de 1,20
- relaxivité R1 (M^{-1} x sec^{-1}) : de l'ordre de 0,202 x 10^5 (mesure dans une solution d'agar à 0,5%, à 39,5°C, 20 MHz).
- relaxivité R2 (M^{-1} x sec^{-1}) : aux environs de 0,671 x 10^5 (mesure dans une solution d'agar à 0,5%, à 39,5°C, 20 MHz).
- données biologiques chez le rat (dose administrée : 40 µmol/kg): demi-vie plasmatique : 184 min, volume de distribution : 19 ml (produit à rémanence vasculaire prolongée).

Résultats d'inhibition des MMP humaines *in vitro*.

Le protocole de mesure de l'effet inihibiteur des particules de fer sur MMP-1 a été le suivant :

principe : évaluation de l'effet inhibiteur du produit testé sur l'activité d'une MMP-1 humaine (isolée de fibroblastes humains de synovie rhumatoïde), quantifié par fluorimétrie (λex=360 nm, λem=465 nm ; mesure de la formation deCys(Me)-His-Ala-Lys-(n-Me-Abz)-NH2 par clivage du substrat DNP-Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys-(n-Me-Abz)-NH2) -protocole décrit dans la référence bibliographique Bickett and al, 1993, Anal.Biochem, 212 :58.

Le produit de référence utilisé dans ce test a été le GM6001 (Ilomastat, Galardin IC_{50} = 3.6E-09).

Plus précisément, le produit à tester, ou le produit de référence ou de l'eau, est ajouté à une solution tampon contenant 7 nM en MMP-1 (activée préalablement au moyen d'acétate de p-aminophenylmercurique). La fluorescence de ce milieu est évaluée après une incubation de 30 min à 37°C (t=0). La réaction enzymatique est ensuite initiée en ajoutant le substrat à une concentration de 10 µM; après une seconde incubation de 40 min à 37°C, la fluorescence est à nouveau évaluée (t=40). L'activité enzymatique est déterminée en soustrayant le signal mesuré à t=0 du signal mesuré à t=40. Le résultat est finalement exprimé en pourcentage d'inhibition de l'activité enzymatique.

Le protocole de mesure de l'effet inihibiteur des particules de fer sur la MMP-3 a été le suivant :

principe : évaluation de l'effet inhibiteur du produit testé sur l'activité d'une MMP-3 humaine (utilisation d'une enzyme recombinante exprimée la lignée

cellulaire sF9), quantifié par fluorimétrie (λex=340 nm, λem=405 nm ; mesure de la formation de Mca-Arg-Pro-Lys-Pro-Tyr-Ala par clivage du substrat Mca-Arg-Pro-Lys-Pro-Tyr-Ala-Nva-Trp-Met-Lys(DNP)-NH2 (NFF2).

Protocole décrit dans la référence Nagase et al., J.Biol.Chem, 269 :20952.

Le produit de référence utilisé dans ce test a été le TIMP-1 (IC_{50} = 3.6E-09).

Plus précisément, le produit à tester, ou le produit de référence ou de l'eau, est ajouté à une solution tampon contenant 6 nM en MMP-3. La fluorescence de ce milieu est évaluée après une incubation de 30 min à 37°C (t=0). La réaction enzymatique est ensuite initiée en ajoutant 10 µM du substrat NFF-2; après une seconde incubation de 90 min à 37°C, la fluorescence est à nouveau évaluée (t=90). L'activité enzymatique est déterminée en soustrayant le signal mesuré à t=0 du signal mesuré à t=90. Le résultat est finalement exprimé en pourcentage d'inhibition de l'activité enzymatique.

Les résultats d'inhibition des MMP humaines par différentes particules de fer recouvertes de polysaccharides (Sinerem et 7228) sont représentés dans les tableaux 1 et 2.

TABLEAU 1 : résultats d'inhibition des MMP-1 humaines par des USPIO.

Produit	Concentration en fer [M]	% d'inhibition de la valeur de référence
Sinerem	1.0E-07	-2
	1.0E-05	-2
	1.0E-03	69
7228	1.0E-07	1
	1.0E-05	-2
	1.0E-03	64

TABLEAU 2 : résultats d'inhibition des MMP-3 humaines par des USPIO.

Produit	Concentration en fer [M]	% d'inhibition de la valeur de référence
Sinerem	1.0E-07	1
	1.0E-05	2
	1.0E-03	71
7228	1.0E-07	0
	1.0E-05	3
	1.0E-03	73

Les résultats démontrent un effet inhibiteur significatif des MMP humaines testées, en présence d'une concentration particulaire de 10^{-3} M en fer.

De telles concentrations en fer (10^{-3} M) sont atteintes dans la pratique courante de l'imagerie médicale, par exemple selon les modalités suivantes:

- Injection intravasculaire de 300 – 3000 µmol de fer à un animal (lapin). Au moment du bolus, la concentration sanguine est typiquement de l'ordre de 1,5 à 15 mM en fer.
- Accumulation moyenne du Sinerem dans les plaques d'athérome de lapins WHHL, après injection intravsculaire de 1000 µmol Fe / kg: 22 µg Fe / g de tissu, soit environ 0,4 mM de Fer.
- Incubation *ex vivo* de carotides humaines prélevées au cours d'une endarectomie, dans une suspension particulaire à 1 mM en fer, pour la détection des MMP-1 et MMP-3 par IRM ou histochimie (coloration de Perl's) ou autre technique (microscopie électronique à transmission, relaxométrie, etc).

REVENDICATIONS

1. Utilisation de particules d'oxyde métallique magnétique recouvertes d'un revêtement dépourvu de composé de ciblage spécifique de MMP, dans la préparation d'un agent de diagnostic par IRM d'une pathologie impliquant au moins une MMP.

2. Utilisation selon la revendication 1 caractérisée en ce que la pathologie se traduit par la présence de plaques d'athérome.

3. Utilisation selon la revendication 1 caractérisée en ce que la pathologie est un cancer, notamment un cancer du sein, colo-rectal, du poumon, de la prostate.

4. Utilisation selon la revendication 1 caractérisée en ce que la pathologie est une maladie inflammatoire et/ou dégénérative, ou une maladie impliquant un mécanisme inflammatoire.

5. Utilisation selon la revendication 1 à 4 caractérisée en ce que la particule est recouverte d'un polysaccharide.

6. Utilisation selon la revendication 5 caractérisée en ce que le polysaccharide est choisi parmi les dextrans.

7. Utilisation selon la revendication 5 caractérisée en ce que le polysaccharide est choisi parmi les dérivés carboxyliques de polysaccharides, de préférence les dérivés carboxyméthylique, carboxyéthylique, carboxypropylique.

8. Utilisation selon la revendication 1 à 4 caractérisée en ce que la particule est recouverte d'un dérivé PEG ou d'un dérivé aminoalcool.

9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 caractérisée en ce que le diamètre du complexe est compris entre 5 et 500 nm, de préférence 5 à 200 nm, encore de préférence 5 et 30 nm.

10. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 caractérisée en ce que l'intensité d'aimentation de l'oxyde métallique est comprise entre 1 et 150 u.em par gramme de métal.

11. Utilisation l'une quelconque des revendications 1 à 10 caractérisée en ce que la relaxivité r1 de la particule est de l'ordre de 10 à 50 mMol-1s-1 et la relaxivité r2 de l'ordre de 20 à 400 mMol-1s-1.

12. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 caractérisée en ce que la dose administrée est de 1µmol/kg à 10 mmol/kg en métal.

13. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 caractérisé en ce que les particules recouvertes sont utilisées en association avec au moins un agent thérapeutique inhibiteur de MMP.

14. Utilisation de particules d'oxyde métallique magnétique recouvertes d'un revêtement dépourvu de composé de ciblage spécifique de MMP, dans la préparation d'un agent de traitement thérapeutique d'une pathologie impliquant au moins une MMP.

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE PARTIEL

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

N° d'enregistrement national

FA 644972
FR 0313224

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	EP 0 600 529 A (STERLING WINTHROP INC) 8 juin 1994 (1994-06-08) * abrégé * * revendications 2,3; exemples 1,4 *	1-6,9-12	A61K49/06 A61P35/00 A61P29/00 A61P9/00
X	EP 0 525 199 A (MEITO SANGYO KK) 3 février 1993 (1993-02-03) * page 5, ligne 1-5; revendication 20; exemple 1 *	1-7,9-12	
X	KANNO S.: "Macrophage accumulation associated with rat cardiac allograft rejection detected by magnetic resonance imaging with ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles" CIRCULATION, vol. 104, 2001, pages 934-938, XP001197213 * abrégé * * page 935, colonne 2, alinéa 2; figure 1 *	1-7,9-12	
X	RAUSCH M: "Dynamic patterns of USPIO enhancement can be observed in macrophages after ischemic brain damage" MAGNETIC RESONANCE MEDICINE, vol. 46, 2001, pages 1018-1022, XP001197215 * abrégé * * page 1018, colonne 2, alinéa 4 *	1-7,9-12	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) A61K
X	SCOTT J.: "MRI of liver: a comparison of CNR enhancement using high dose and low dose ferumoxide infusion in patients with colorectal liver metastases" MAGNETIC RESONANCE IMAGING, vol. 18, 2000, pages 297-303, XP001197217 * page 298, colonne 2, alinéa 2 *	1-7,9-14	

-/--

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
8 juillet 2004	Gonzalez Ramon, N

CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES

X : particulièrement pertinent à lui seul
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie
A : arrière-plan technologique
O : divulgation non-écrite
P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons

.....

& : membre de la même famille, document correspondant

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C35)

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE PARTIEL

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

N° d'enregistrement national

FA 644972
FR 0313224

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	SCHMITZ S. ET AL: "Magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaques using superparamagnetic iron oxide particles" JOURNAL OF MAGNETIC RESONANCE IMAGING, vol. 14, 2001, pages 355-361, XP002287697 * abrégé *	1-7,9-12	
X	ZHANG Y. ET AL: "Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake" BIOMATERIALS, vol. 23, 2002, pages 1553-1561, XP004348166 * abrégé * * page 1554, colonne 2 *	1,3, 8-12,14	
X	PULFER S K ET AL: "ENHANCED BRAIN TUMOR SELECTIVITY OF CATIONIC MAGNETIC POLYSACCHARIDE MICROSPHERES" JOURNAL OF DRUG TARGETING, HARWOOD ACADEMIC PUBLISHERS GMBH, DE, vol. 6, no. 3, 1998, pages 215-227, XP001070007 ISSN: 1061-186X * abrégé *	14	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
X	KENT E. ET AL: "blood pool agents for MRA" SEMINARS IN INTERVENTIONAL RADIOLOGY, vol. 15, 1998, pages 215-222, XP008032662 * abrégé; tableau 1 *	1,5-7, 9-12	

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
8 juillet 2004	Gonzalez Ramon, N

CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES

X : particulièrement pertinent à lui seul
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie
A : arrière-plan technologique
O : divulgation non-écrite
P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons

& : membre de la même famille, document correspondant

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C35)

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0313224 FA 644972

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 08-07-2004
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0600529 A	08-06-1994	US 5349957 A	27-09-1994
		AU 4747193 A	16-06-1994
		CA 2107280 A1	03-06-1994
		CZ 9302601 A3	17-08-1994
		EP 0600529 A2	08-06-1994
		FI 935302 A	03-06-1994
		HU 69399 A2	28-09-1995
		JP 6218271 A	09-08-1994
		MX 9306009 A1	31-01-1995
		NO 934270 A	03-06-1994
		NZ 248701 A	26-09-1995
		SK 135093 A3	07-09-1994
EP 0525199 A	03-02-1993	AU 652804 B2	08-09-1994
		DE 69229150 D1	17-06-1999
		DE 69229150 T2	30-09-1999
		DK 525199 T3	01-11-1999
		EP 0525199 A1	03-02-1993
		JP 2921984 B2	19-07-1999
		LU 91003 A9	24-03-2003
		NO 923584 A	12-11-1992
		US 5328681 A	12-07-1994
		AT 179894 T	15-05-1999
		AU 1168992 A	27-08-1992
		CA 2078679 A1	20-07-1992
		ES 2131067 T3	16-07-1999
		WO 9212735 A1	06-08-1992

EPO FORM P0465

RECHERCHE INCOMPLÈTE
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE C

Numéro de la demande

FA 644972
FR 0313224

Certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche parce qu'elles se rapportent à des parties de la demande qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:

Revendications ayant fait l'objet de recherches incomplètes:
1-14

Raison pour la limitation de la recherche:

Les revendications 1-14 présentes ont trait à une très grande variété de composés définis en faisant référence a une charactéristique souhaitable: "dépourvu de composé de ciblage spécifique de MMP" (revendications 1, 14); "agent théreapeutique inhibiteur de MMP" (revendication 13). Un fondement au sens de L'Article L.612-6 CPI et un exposé au sens de l'Article L.612-5 CPI ne peut cependant être trouvé que pour un nombre très restreint de ces composés revendiqués.
Dans le cas présent, les revendications manquent à un tel point de fondement et l'exposé de l'invention dans la description est si limité q'une recherche significative couvrant tout le spectre revendiqué est impossible. Par conséquent, la recherche a été limitée aux parties des revendications qui présentent un fondement et un exposé, c'est à dire les parties ayant trait aux composés préparés dans les exemples et mentionnés dans les revendications 5-8.
Les revendications 1, 14 relative à une indication médicale "une pathologie impliquant au moins une MMP" n'est pas recevable en vertu de l'article L.612-6 CPI. L'utilisation thérapeutique est définie fonctionnellement par un mécanisme d'action qui ne permet pas une application pratique sous la forme d'un véritable traitement bien défini d'un état pathologique (maladie).