



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2001/04/27
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2001/11/08
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2002/10/22
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2001/001322
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2001/082969
(30) Priorité/Priority: 2000/04/28 (00/05438) FR

(51) Cl.Int.⁷/Int.Cl.⁷ A61K 45/06, A61K 31/55, A61P 35/00

(71) Demandeurs/Applicants:
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE, FR;
INSTITUT CURIE, FR

(72) Inventeurs/Inventors:
DECAUDIN, DIDIER, FR;
KROEMER, GUIDO, FR;
POUPON, MARIE-FRANCE, FR;
NEMATI, FARIBA, FR;
BEURDELEY-THOMAS, ARNAUD, FR

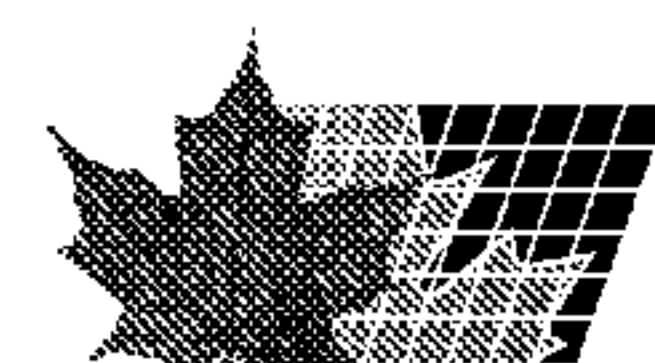
(74) Agent: GOUDREAU GAGE DUBUC

(54) Titre : **MEDICAMENTS DESTINES AU TRAITEMENT DES PATHOLOGIES TUMORALES CONTENANT LE
COMPOSE RO5-4864 ET UN AGENT INDUCTEUR DE L'APOPTOSE**

(54) Title: **MEDICINES FOR TREATING TUMORAL PATHOLOGIES CONTAINING THE RO5-4864 COMPOUND AND
AN APOPTOSIS-INDUCING AGENT**

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention a pour objet l'utilisation du composé Ro5-4864, et de composés dérivés de ce dernier, pour la préparation de médicaments destinés au traitement des pathologies tumorales. L'invention concerne également les composés susmentionnés en association avec un agent inducteur de l'apoptose, comme produits de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, en thérapie cancéreuse.



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
8 novembre 2001 (08.11.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/82969 A3(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61K 45/06, A61P 35/00 // (A61K 45/06, 31:55)(74) Mandataires : DEMACHY, Charles etc.; Gros-
set-Fournier & Demachy SARL, 20, rue de Maubeuge,
F-75009 Paris (FR).(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/01322(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Date de dépôt international : 27 avril 2001 (27.04.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/05438 28 avril 2000 (28.04.2000) FR(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris
Cedex 16 (FR). INSTITUT CURIE [FR/FR]; 26, rue
d'Ulm, F-75248 Paris Cedex 05 (FR).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : DE-
CAUDIN, Didier [FR/FR]; 44, rue d'Estienne d'Orves,
F-91370 Verrières-le-Buisson (FR). KROEMER, Guido
[AT/FR]; 54, rue Daguerre, F-75014 Paris (FR). POUPON,
Marie-France [FR/FR]; 38, rue Emile Zola, F-94260
Fresnes (FR). NEMAT, Fariba [FR/FR]; 5, rue Jean
Cottin, F-75018 Paris (FR). BEURDELEY-THOMAS,
Arnaud [FR/FR]; 6, rue des Favorites, F-75015 Paris (FR).(88) Date de publication du rapport de recherche
internationale: 18 avril 2002*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.*(54) Title: MEDICINES FOR TREATING TUMORAL PATHOLOGIES CONTAINING THE RO5-4864 COMPOUND AND AN
APOPTOSIS-INDUCING AGENT(54) Titre : MEDICAMENTS DESTINÉS AU TRAITEMENT DES PATHOLOGIES TUMORALES CONTENANT LE COM-
POSE RO5-4864 ET UN AGENT INDUCTEUR DE L'APOPTOSE(57) Abstract: The invention concerns the use of Ro5-4864, and compounds derived therefrom, for preparing medicines for treat-
ing tumoral pathologies. The invention also concerns said compounds combined with an apoptosis-inducing agent, as combination
products for simultaneous, separate or prolonged use, in cancer therapy.(57) Abrégé : La présente invention a pour objet l'utilisation du composé Ro5-4864, et de composés dérivés de ce dernier, pour
la préparation de médicaments destinés au traitement des pathologies tumorales. L'invention concerne également les composés
susmentionnés en association avec un agent inducteur de l'apoptose, comme produits de combinaison pour une utilisation simultanée,
séparée ou étalée dans le temps, en thérapie cancéreuse.

WO 01/82969 A3

UTILISATION DU COMPOSE Ro5-4864 ET DE COMPOSES DERIVES POUR LA PREPARATION DE MEDICAMENTS DESTINES AU TRAITEMENT DES PATHOLOGIES TUMORALES

5

La présente invention a pour objet l'utilisation du composé Ro5-4864, et de composés dérivés de ce dernier répondant à la formule (I) ci-après, pour la préparation de médicaments destinés au traitement des pathologies tumorales.

10

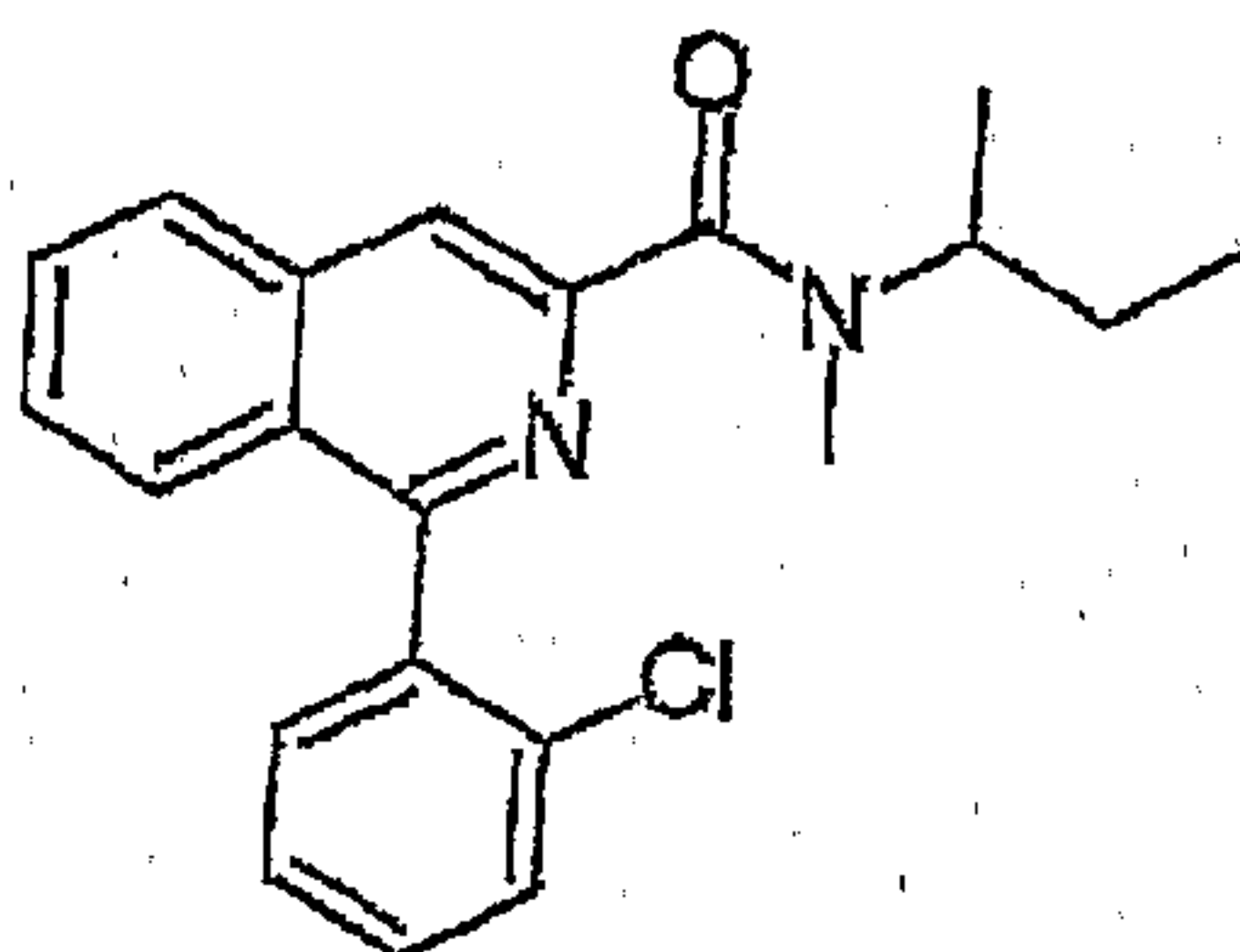
Actuellement, la cancérothérapie consiste en l'utilisation de la radiothérapie, de la chimiothérapie, ou de leur combinaison. Parmi les produits utilisés en chimiothérapie, on trouve les composés inducteurs de l'apoptose, à savoir les composés ayant un effet de stimulation de la mort programmée des cellules. Ces méthodes ont des effets secondaires néfastes, et sont mal supportées par les patients.

15

L'utilisation d'agents pharmacologiques visant à augmenter la susceptibilité des cellules tumorales à l'induction de l'apoptose, serait très avantageuse dans la mesure où elle permettrait de réduire sensiblement la posologie des composés directement ou indirectement inducteurs d'apoptose utilisés en radio ou chimiothérapie.

A ce titre, le composé PK11195 de formule suivante

20



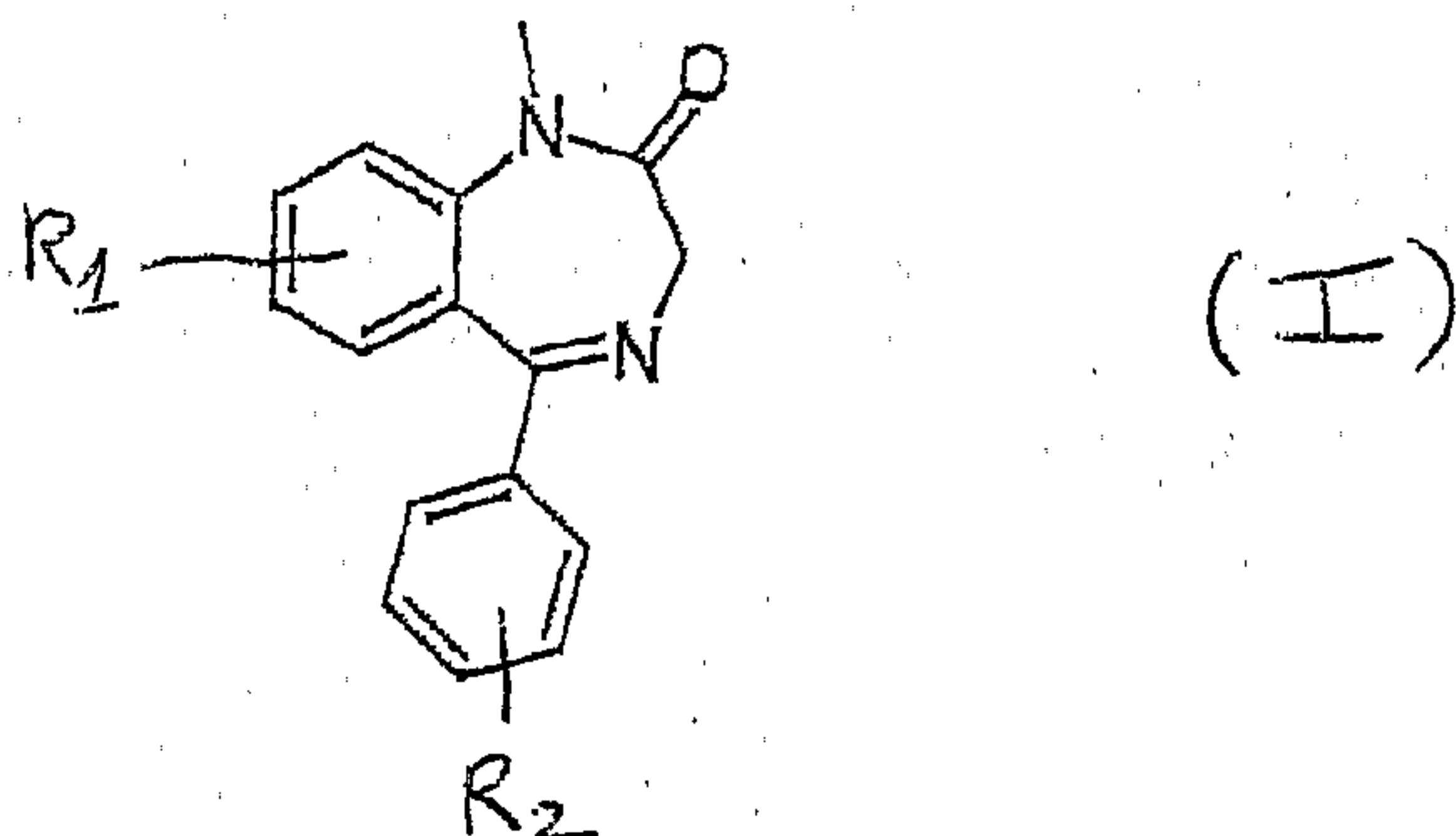
25

est décrit dans la demande internationale WO 99/66958 pour la préparation de médicaments destinés au traitement de cancers, en combinaison avec des inducteurs d'apoptose.

30

La présente invention découle de la mise en évidence sur un modèle expérimental animal par les Inventeurs du fait que le composé Ro5-4864, et les composés dérivés de ce dernier répondant à la formule (Ia) ci-après, ont un effet de stimulation de l'apoptose induite par les composés inducteurs d'apoptose, supérieur à celui observé avec le Diazépam et le composé PK11195 indiqué ci-dessus.

La présente invention a pour objet l'utilisation d'au moins un composé choisi parmi ceux de formule (I) suivante :



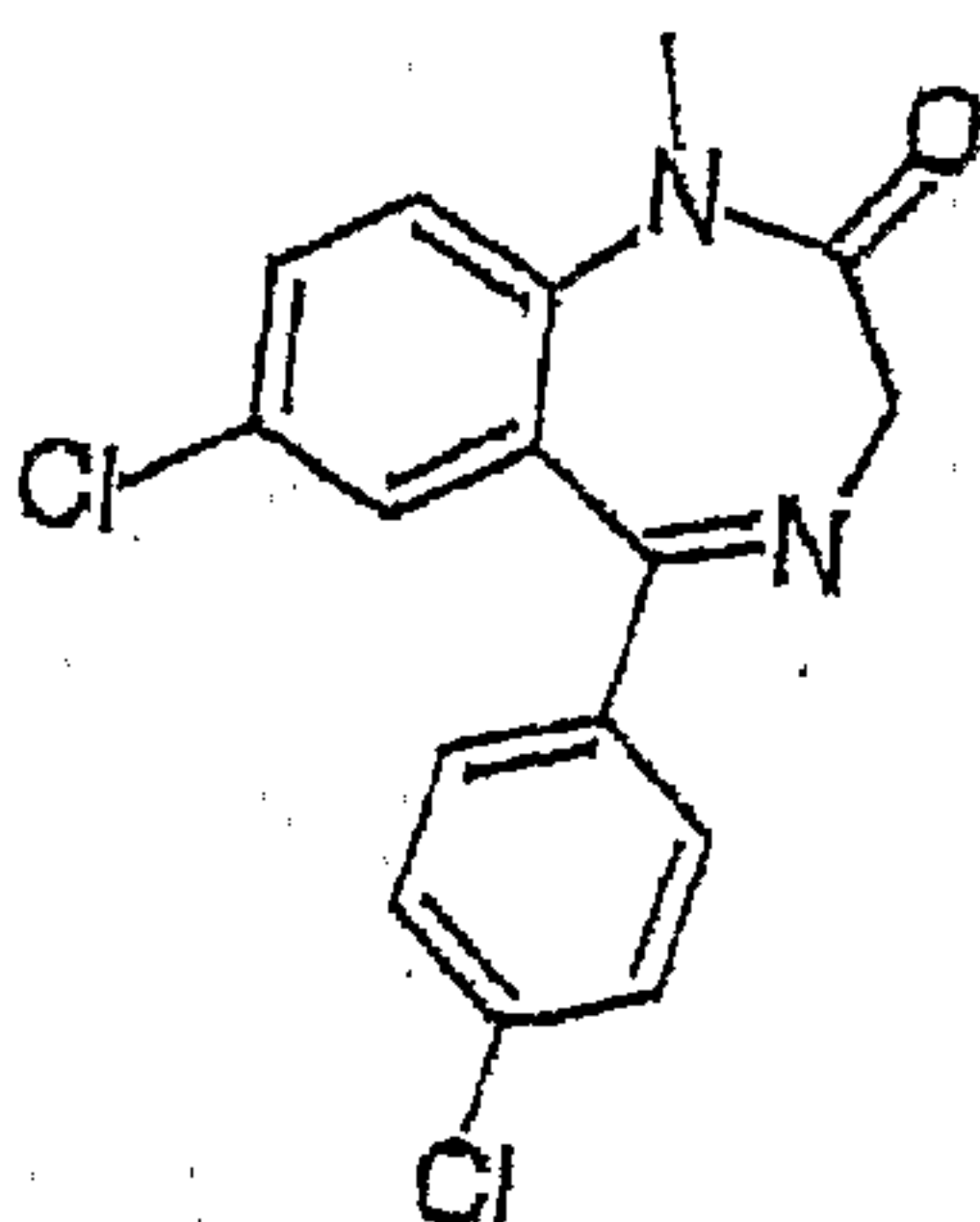
dans laquelle :

- 15
- R₁ représente un atome d'hydrogène, ou un atome d'halogène tel que Cl,
 - R₂ un atome d'halogène tel que Cl,

pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des pathologies tumorales, ledit composé étant avantageusement en association avec au moins un agent inducteur de l'apoptose, dans le cadre de produits de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, en thérapie cancéreuse.

20

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée, du composé Ro5-4864 de formule suivante :



L'invention a plus particulièrement pour objet les produits comprenant :

* au moins un composé de formule (I) ci-dessus dans laquelle R_1 et R_2 représentent un atome d'halogène tel que Cl,

* et au moins un agent inducteur de l'apoptose, comme produits de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, en thérapie cancéreuse.

Des produits de combinaison définis ci-dessus préférés dans le cadre de la présente invention sont ceux comprenant à titre de composé de formule (I) le composé Ro5-4864 dont la formule est indiquée ci-dessus.

L'invention concerne également les produits de combinaison tels que définis ci-dessus, comprenant au moins un agent inducteur de l'apoptose, le cas échéant inséré dans un vecteur approprié pour la thérapie génique, notamment un vecteur d'origine viral, ledit agent étant choisi parmi ceux qui endommagent l'ADN, les ligands naturels ou synthétiques du récepteur aux glucocorticoïdes, ou autres composés pro-apoptotiques.

L'invention a plus particulièrement pour objet les produits de combinaison tels que définis ci-dessus, caractérisés en ce que l'agent inducteur de l'apoptose est choisi parmi :

- les dérivés des glucocorticoïdes, tels que la dexaméthasone,

- les agents alkylants tels que :

- . les moutardes à l'azote, notamment le cyclophosphamide,

- . les complexes de platine,

- . les dérivés de l'éthylène-imine,

- . les dérivés de diméthane sulfonoxo-alcanes,

- . les dérivés de la pipérazine,

- les inhibiteurs des topoisomérases tels que :

- . les inhibiteurs de la topoisomérase 2, notamment les anthracyclines, l'épipodophyllotoxine tel que l'étoposide,

- . les inhibiteurs de la topoisomérase 1, notamment les dérivés de la camptothécine,

- les antimétabolites tels que :

- . les antifolates, notamment le méthotrexate,

- . les antipurines, notamment la 6-mercaptopurine,

- . les antipyrimidines, notamment la 5-fluorouracile,

- les antimitotiques tels que :

. les vinca-alcaloïdes,

. les taxoïdes, notamment le taxol, le taxotere,

- les composés cytolytiques tels que :

. la bléomycine,

. la dacarbazine,

. l'hydroxycarbamide,

. l'asparaginase,

. la mitoguazone,

. la plicamycine,

- les radiations gamma,

- l'étoposide,

- la doxorubicine,

- des composés tels que la lonidamine ou dérivés,

- des anticorps monoclonaux ou autres, ou tout composé ou autre traitement d'immunothérapie.

De préférence, les produits de combinaison susmentionnés de l'invention, contiennent un produit de formule (I) dans laquelle R_1 et R_2 représentent un atome d'halogène tel que Cl, avantageusement le composé RO5-4864, et un agent inducteur d'apoptose dans un rapport en poids d'environ 1 : 5 à environ 1 : 1.

De préférence encore, les doses de RO5-4864 envisagées chez l'homme se situent entre 1 et 10 mg quotidiens.

Avantageusement, les produits de combinaison susmentionnés de l'invention, comprennent aussi un ou plusieurs véhicules pharmaceutiquement acceptables, et se présentent sous une forme administrable par voie orale ou parentérale, notamment par voie intramusculaire, intraveineuse, ou sous-cutanée.

L'invention concerne également l'utilisation de produits de combinaison susmentionnés, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des pathologies tumorales telles que définies ci-dessus.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description qui suit de la mise en œuvre d'expériences de mesure de l'effet du composé Ro5-4864 de stimulation de l'apoptose induite par les composés inducteurs d'apoptose.

- Matériel : souris nu/nu femelles, d'un poids de 30 g, âgées de 6-8 semaines. Élevage dans des conditions dépourvues d'agents pathogènes, sous lumière artificielle (12 heures de clarté, 12 heures d'obscurité).

- Greffe sous-cutanée interscapulaire des tumeurs humaines étudiées.

- Traitement des souris avec un composé inducteur d'apoptose tel que défini ci-dessus, et le composé Ro5-4864, lorsque les tumeurs atteignent un diamètre d'environ 5 mm (ou un volume de 60 mm³).

- Pesée hebdomadaire des souris. Mesure 3 fois par semaine des tumeurs.

- Analyse : mesure du volume tumoral (V) et du volume tumoral relatif (VTR) :

- $V = a^2 \times b/2$, a le plus grand diamètre et b le plus petit diamètre de la tumeur.

- $VTR = V_x/V_i$, V_x le volume moyen au temps x, V_i le volume moyen au temps JO.

- Comparaison des résultats obtenus chez les souris traitées par le composé inducteur d'apoptose seulement, avec les résultats obtenus d'une part chez les souris traitées par le composé inducteur d'apoptose et le composé Ro5-4864, et, d'autre part chez les souris traitées par le composé Ro5-4864 seul.

- Sacrifice des souris lorsque les tumeurs atteignent un volume de 2500 mm³.

I- Introduction

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est contrôlée au niveau d'un effecteur central commun localisé au niveau des mitochondries (Kroemer and Reed, 2000). La perméabilité membranaire mitochondriale (membrane externe) constitue l'événement irréversible qui induit la mort cellulaire. Cette perméabilité est sous contrôle, d'une part, d'un complexe multiprotéique permettant l'ouverture ou la fermeture de pores membranaires et, d'autre part, de protéines régulatrices comme Bcl-2 ou Bax.

Dans ce complexe multiprotéique, appelé pore de transition de perméabilité, se trouve le récepteur périphérique des benzodiazépines (RPB) (Zoratti and Szabo, 1995). Il existe deux sites de fixation des benzodiazépines : les récepteurs centraux localisés dans le SNC et

au niveau de la membrane plasmique des cellules, et les récepteurs périphériques localisés principalement au niveau de la membrane externe mitochondriale. De même, il existe différents types de ligands des RPB : des ligands endogènes (DBI ou *diazepam binding inhibitor* et porphyrines) et des ligands exogènes (les Benzodiazépines comme le diazépam et le 4' chlorodiazépam (ou RO5-4864) et les carboxamides d'isoquinolines comme le PK11195).

Nous avons montré, sur différentes lignées cellulaires, que l'effet antitumoral des anticorps anti-Fas-récepteur (FasR) était augmenté par des ligands du RPB (RO5-4864, diazépam et PK11195) et que cet effet était nettement (au moins 3 ou 4 fois) supérieur avec le RO-4864 qu'avec les autres composés. D'autre part, seul le RO5-4864 est capable, sur une lignée transfectée par un gène de résistance à l'apoptose telle que les lignées surexprimant les gènes *bcl-2* ou *bcl-X_L*, d'augmenter l'effet apoptotique des anticorps anti-FasR. De même, sur deux tumeurs humaines de carcinome bronchique à petites cellules greffées chez la souris *nude*, nous avons montré que le RO5-4864 augmentait l'effet de la chimiothérapie antitumorale.

II- Matériel et méthodes :

1- Lignées cellulaires, conditions de culture et induction de l'apoptose :

Les lignées humaines Jurkat (lymhoïde T), SHEP (neuroblastome) transfecté avec un vecteur contrôle ou avec un vecteur *bcl-2* ou *bcl-X_L*, 143N2 (ostéosarcome) et SNB79 (glioblastome) ont été cultivées en DMEM ou RPMI 1640 (Sigma Chemical C°, St Louis, MO) supplémenté en SVF 10% (Dutscher, Brumath, France), pénicilline G(10² UI/ml) + streptomycine (50 µg/ml) (Sigma) et L-glutamine (2nM, Sigma).

Les cellules ont été cultivées en présence d'anticorps anti-FasRécepteur CH11 (1 µg/ml ; Immunotech, Marseille, France) concomitamment ou après exposition au RO5-4864 (BioBlock Scientific, Illkirch, France), diazépam (Roche, Neuilly sur Seine, France), ou PK11195 (BioBlock), à différentes concentrations.

2- Quantification de l'apoptose et de la viabilité cellulaire :

Le fluorochrome lipophile DiOC₆(3) (Molecular Probes, Eugene, OR) a été utilisé pour mesurer le potentiel membranaire des mitochondries ($\Delta\psi_m$). Brièvement, les cellules ont été incubées 15 min à 37°C en présence de 40nM de DiOC₆(3), avec analyse immédiate de l'incorporation de la fluorescence sur un cytofluoromètre de type Epics Profile II (Coulter, Miami, FL). L'hydroéthidine (HE) (2 μ M, 15 min à 37°C, Molecular Probes) a été utilisée pour mesurer la production d'anion superoxyde (Marchetti et al., 1996). Enfin, la proportion de cellules ayant perdu une partie de l'ADN chromosomal (cellules subdiploïdes) a été déterminée par iodure de propidium sur cellules fixées en éthanol (Nicoletti et al, 1991).

La viabilité cellulaire a été mesurée par un test au bleu de méthylène (Dimanche-Boitrel et al., 1992).

3- Etudes *in vivo* :

Des souris suisses, nu/nu, femelles, âgées de 6 à 8 semaines et pesant environ 30g, ont été utilisées pour les expériences *in vivo*. Pour les essais thérapeutiques, les souris greffées avec les tumeurs humaines ont été randomisées en groupes équivalents de 4 à 8 animaux et traitées dès que la tumeur atteignait un diamètre de 5 mm (soit un volume approximatif de 60 mm³). La croissance tumorale a été évaluée par la mesure des deux diamètres tumoraux perpendiculaires.

Deux tumeurs humaines de carcinome bronchique à petites cellules ont été utilisées, la SCLC6 et la SCLC61.

La chimiothérapie, administrée par voie intrapéritonéale, a comporté, soit de l'étoposide seul à la dose de 12 mg/kg/j J1 à J3, soit une association étoposide 12 mg/kg/j + ifosfamide 90 mg/kg/j de J1 à J3. Le RO5-4864 a été préparé dans un excipient contenant éthanol + Tween et injecté par voie sous-cutanée à la dose 12 à 40 mg/kg/j de J1 à J3. Le groupe témoin a reçu des injections de sérum physiologique.

4- Analyses statistiques :

Un test student *t* a été utilisé pour comparer la croissance des tumeurs xénogreffées chez les souris *nude* des différents groupes randomisés.

III- Résultats :

1- Etudes *in vitro* :

Sur la lignée lymphoïde T Jurkat, le RO5-4864, le diazépam et le PK11195 potentialisent l'effet apoptotique de l'anticorps anti-FasR CH11 (Fig. 1A et 1B). Cet effet est maximal avec le RO5-4864 puisque, à concentration équivalente de 60 μ M, la proportion de cellules subdiploïdes (apoptotiques) est de 73%, 25% et 20% pour le RO5-4864, le PK11195 et le diazépam, respectivement, en association avec le CH11.

Le RO5-4864 reverse la résistance à l'anticorps anti-FasR CH11 des lignées SHEP-contrôle, SHEP-bcl-2, ou bcl-X_L, 143N2 et SNB79. Inversement, cette réversion n'est observée avec le diazépam et le PK11195 que sur la seule lignée SHEP-contrôle (fig. 2, 3 et 4).

2- Etudes *in vivo* :

Les souris greffées avec la tumeur humaine SCLC61 ont été traitées par l'étoposide injecté par voie intrapéritonéale à la dose de 12 mg/kg/j de J1 à J3, avec ou sans RO5-4864 à la dose de 12 mg/kg/j SC J1 à J3. La croissance tumorale n'a pas été modifiée par le RO5-4864 seul. Par contre, l'effet antitumoral de l'étoposide est augmenté par l'administration concomitante de RO5-4864 ($p < 0.005$) (fig. 5A). L'excipient du RO5-4864, injecté seul ou en association avec l'étoposide, ne modifie pas la croissance tumorale du groupe contrôle et du groupe étoposide.

Les tumeurs SCLC6 greffées ont été traitées par l'association étoposide 12 mg/kg/j + ifosfamide 90 mg/kg/j de J1 à J3, avec ou sans RO5-4864 40 mg/kg/j de J1 à J3. L'effet antitumoral de la chimiothérapie a été augmenté par le RO5-4864 ($p < 0.05$) (fig. 5B).

IV- Conclusion

L'ensemble de ces expériences montre que le RO5-4864, sur plusieurs variétés de lignées humaines, est capable de lever la résistance aux anticorps anti-FasR et, sur 2 tumeurs de carcinome bronchique à petites cellules, d'augmenter l'effet antitumoral d'une chimiothérapie associant étoposide +/- ifosfamide. De plus, sur la lignée de neuroblastome humain SHEP transfectée par les gènes *bcl-2* ou *bcl-X_L*, le RO5-4864 reverse la résistance aux anticorps anti-FasR.

Différentes expériences ont montré que l'effet du RO5-4864 était nettement supérieur à celui du diazépam ou du PK11195 et que, en particulier, le RO5-4864 était le seul capable de réverser la résistance aux anticorps anti-FasR sur la lignée SHEP transfectée par les gènes *bcl-2* ou *bcl-X_L*.

V- Références :

Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. Nat Med 2000 ;6 :513-19.

Zoratti M, Szabo I. The mitochondrial permeability transition. Biochem Biophys Acta Rev Biomembr 1995 ;1241 :139-76.

Marchetti P, Hirsch T, Zamzami N, Castedo M, Decaudin D, Susin SA, et al. Mitochondrial permeability transition triggers lymphocyte apoptosis. J Immunol 1996 ;157 :4830-6.

Nicoletti I, Migliorati G, Plaghiacci MC, Riccardi C. A rapid simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J Immunol Methods 1991 ;139 :271-80.

Dimanche-Boitrel M-T, Pelletier H, Genne P, Petit J-M, Le Grimellec C, Canal P, et al. Confluence-dependent resistance in human colon cancer cells : role of reduced drug

accumulation and low intrinsic chemosensitivity of resting cells. Int. J. Cancer 1992 ; 50 :677-82.

VI- Légendes des figures :

1. Figure 1 : culture des cellules Jurkat en présence de CH11 avec (histogrammes blancs) ou sans (histogrammes noirs) RO5-4864, PK11195 ou diazépam. En A, détermination de la proportion de cellules subdiploïdes (en ordonnée), en fonction de la concentration en μM des ligands PBR RO5-4864, PK11195 et DIAZEPAM. En B, détermination du % de cellules (en ordonnée), avec chute du ($\Delta\psi\text{m}$) (histogrammes noirs), production d'anion superoxide (histogrammes gris) et subdiploïdes (histogrammes blancs), en absence (o) ou en présence d'anticorps antiFas CH11 (encore désigné Mab); en fonction de la concentration en μM des ligands PBR RO5-4864 (à $30\mu\text{M}$ ou RO30, et à $60\mu\text{M}$ ou RO60), PK11195 (à $40\mu\text{M}$ ou PK40, et à $60\mu\text{M}$ ou PK60) et DIAZEPAM (à $90\mu\text{M}$ ou DIA90, et à $120\mu\text{M}$ ou DIA120).

2. Figure 2 : culture des lignées SHEP de contrôle (SHEP.control), des lignées SHEP transfectées par bcl2 (SHEP.Bcl2), et des lignées SHEP transfectées par bclX_L (SHEP.BclX_L), en présence de CH11 avec (histogrammes noirs) ou sans (histogrammes gris) RO5-4864. Evaluation de la viabilité cellulaire (test au bleu de méthylène; pourcentage de cellules en ordonnée), en fonction de la concentration de RO5-4864 (0, $100\mu\text{M}$ ou RO 100, $200\mu\text{M}$ ou RO 200).

3. Figure 3 : culture de la lignée 143N2 en présence de CH11 avec (histogrammes noirs) ou sans (histogrammes gris) RO5-4864, PK11195 ou diazépam. Évaluation de la viabilité cellulaire (test au bleu de méthylène; pourcentage de cellules en ordonnée), en fonction de la concentration de RO5-4864 ($100\mu\text{M}$ ou RO 100, $200\mu\text{M}$ ou RO 200), PK11195 ($50\mu\text{M}$ ou PK50, $80\mu\text{M}$ ou PK80) et DIAZEPAM ($50\mu\text{M}$ ou DIA50, $80\mu\text{M}$ ou DIA80).

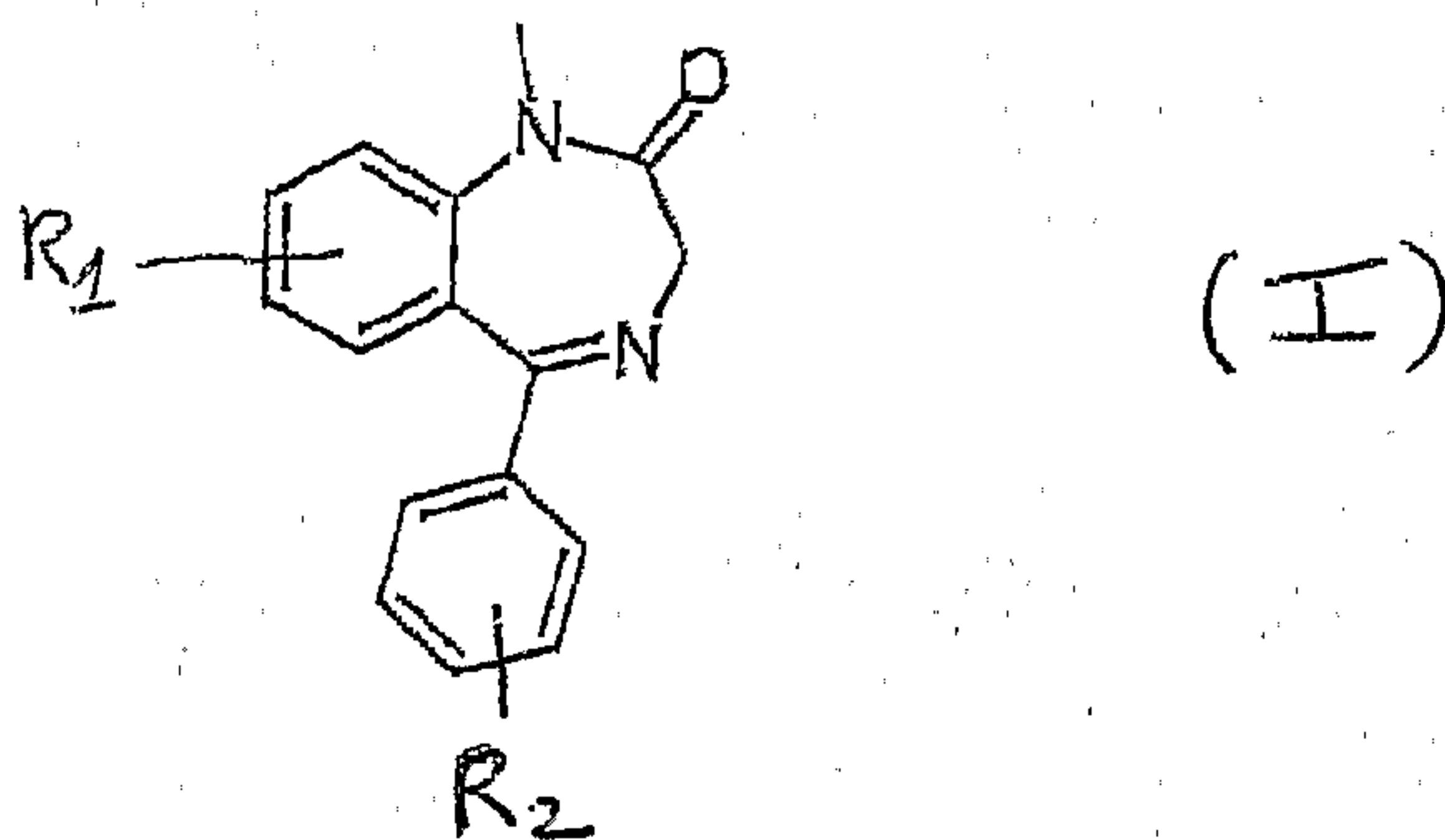
4. Figure 4 : culture de la lignée SNB79 en présence de CH11 avec (●) ou sans (○) RO5-4684. Évaluation de la viabilité cellulaire (test au bleu de méthylène; pourcentage de cellules en ordonnée), en fonction de la concentration (μ M) de RO5-4864.

5. Figure 5 : en A, tumeur SCLC61 xenogreffée chez la souris *nude* et traitée par étoposide avec (○) ou sans (▲) RO5-4684. Deux groupes contrôles ont reçu l'excipient du RO5-4864 seul (Δ) ou avec étoposide ($\diamond$). En B, tumeur SCLC6 xenogreffée chez la souris *nude* et traitée par étoposide + ifosfamide avec (○) ou sans (▲) RO5-4684. Le volume médian des tumeurs est indiqué en ordonnée en fonction du nombre de jours après le début du traitement. Deux groupes contrôles ont reçu des injections soit de RO-4864 seul ($\square$), soit de NaCl 0,9% (●).

REVENDICATIONS

1. Produits comprenant :

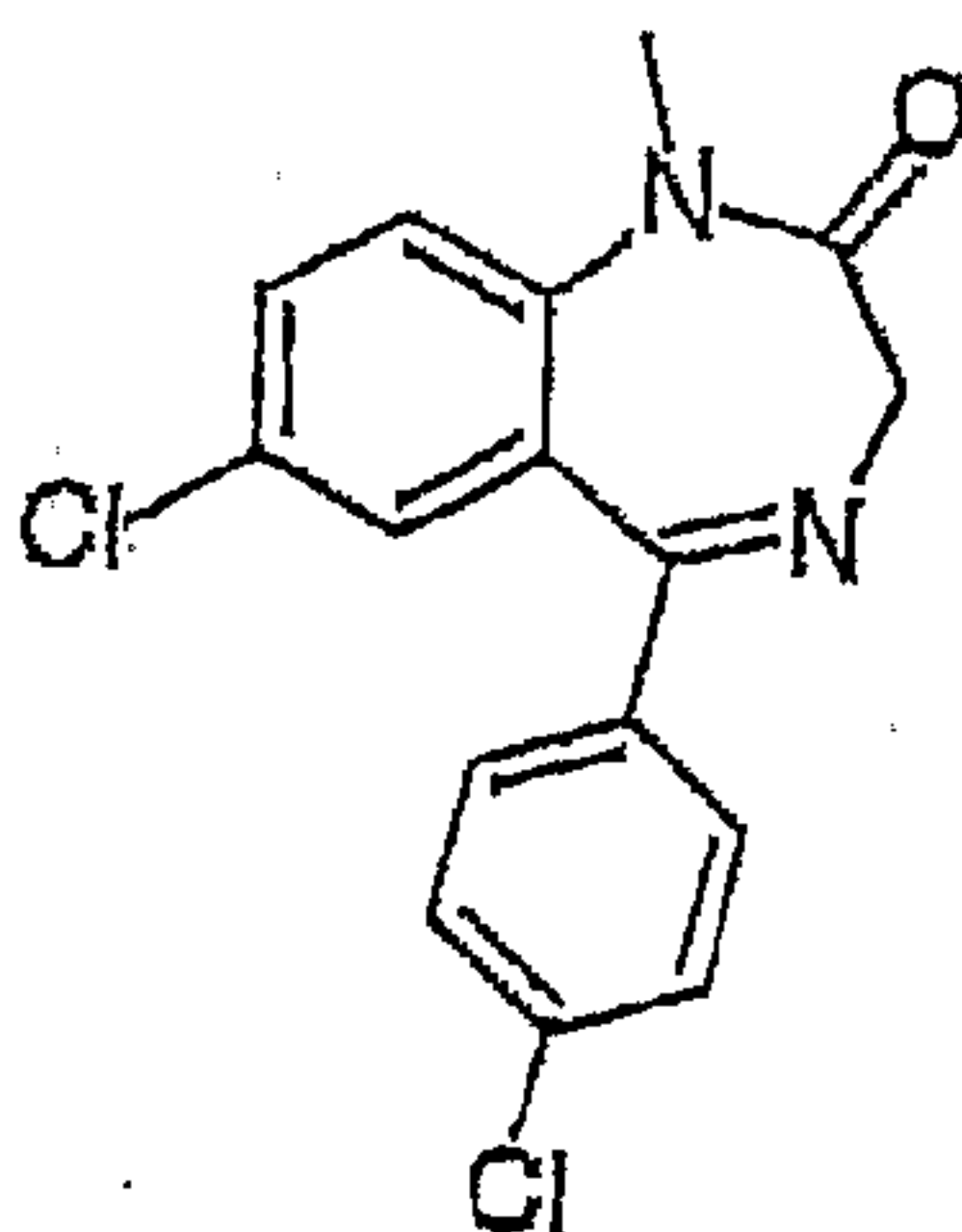
* au moins un composé de formule (I) suivante :



dans laquelle R_1 et R_2 représentent un atome d'halogène tel que Cl,

* et au moins un agent inducteur de l'apoptose, comme produits de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, en thérapie cancéreuse.

2. Produit selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend à titre de composé de formule (I) le composé Ro5-4864 de formule suivante :



3. Produit selon la revendication 1 ou 2, se présentant sous une forme administrable par voie orale ou parentérale, notamment par voie intramusculaire ou intraveineuse.

5 4. Produit selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un agent inducteur de l'apoptose, le cas échéant inséré dans un vecteur approprié pour la thérapie génique, notamment un vecteur d'origine viral, ledit agent étant choisi parmi ceux qui endommagent l'ADN, les ligands naturels ou synthétiques du récepteur aux glucocorticoïdes, ou autres composés pro-apoptotiques.

10 5. Produit selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'agent inducteur de l'apoptose est choisi parmi :

- les dérivés des glucocorticoïdes, tels que la dexaméthasone,
- les agents alkylants tels que :

- 15 . les moutardes à l'azote, notamment le cyclophosphamide,
- . les complexes de platine,
- . les dérivés de l'éthylène-imine,
- . les dérivés de diméthane sulfonoxo-alcanes,
- . les dérivés de la pipérazine,

- 20 - les inhibiteurs des topoisomérases tels que :

- . les inhibiteurs de la topoisomérase 2, notamment les anthracyclines, l'épipodophyllotoxine tel que l'étoposide,
- . les inhibiteurs de la topoisomérase 1, notamment les dérivés de la camptothécine,

- 25 - les antimétabolites tels que :

- . les antifolates, notamment le méthotrexate,
- . les antipurines, notamment la 6-mercaptopurine,
- . les antipyrimidines, notamment la 5-fluorouracile,

- les antimitotiques tels que :

- 30 . les vinca-alcaloïdes,
- . les taxoïdes, notamment le taxol, le taxotere,

- les composés cytolytiques tels que :

- . la bléomycine,
- . la dacarbazine,
- . l'hydroxycarbamide,
- 5 . l'asparaginase,
- . la mitoguazone,
- . la plicamycine,

- des composés tels que la lonidamine ou dérivés,

- ou des anticorps monoclonaux ou autres, ou tout composé ou autre traitement
10 d'immunothérapie.

6. Produit selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un agent inducteur de l'apoptose choisi parmi :

- les radiations gamma,
- 15 - l'étoposide,
- la doxorubicine,
- la dexaméthasone,
- la lonidamine.

20 7. Produits selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisés en ce qu'ils contiennent un produit de formule (I) et un agent inducteur d'apoptose dans un rapport en poids d'environ 1 : 5 à environ 1 : 1.

25 8. Produits selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisés en ce qu'ils comprennent aussi un ou plusieurs véhicules pharmaceutiquement acceptables.

9. Utilisation de produits selon l'une des revendications 1 à 8, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des pathologies tumorales.

1/4

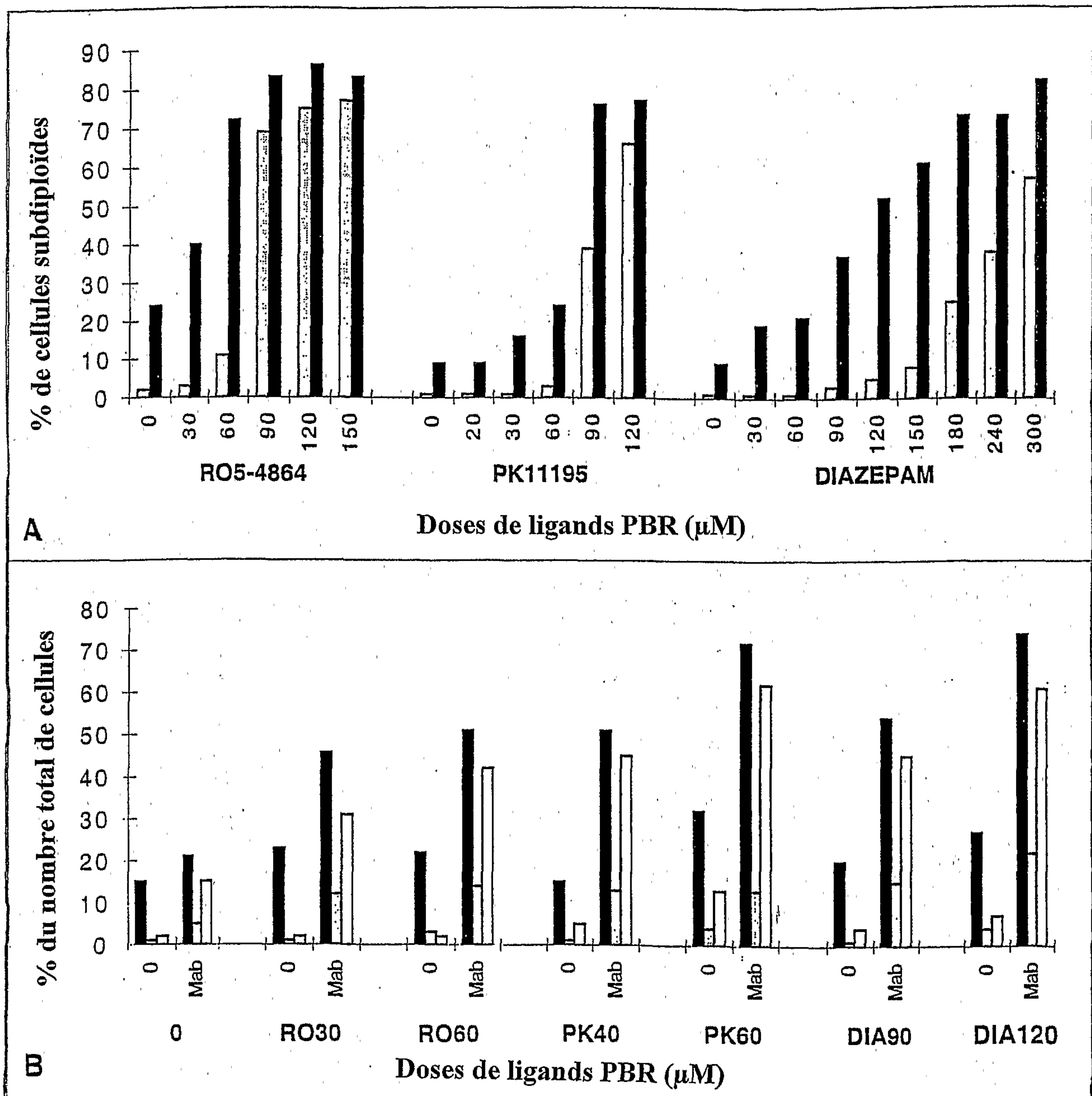


FIGURE 1

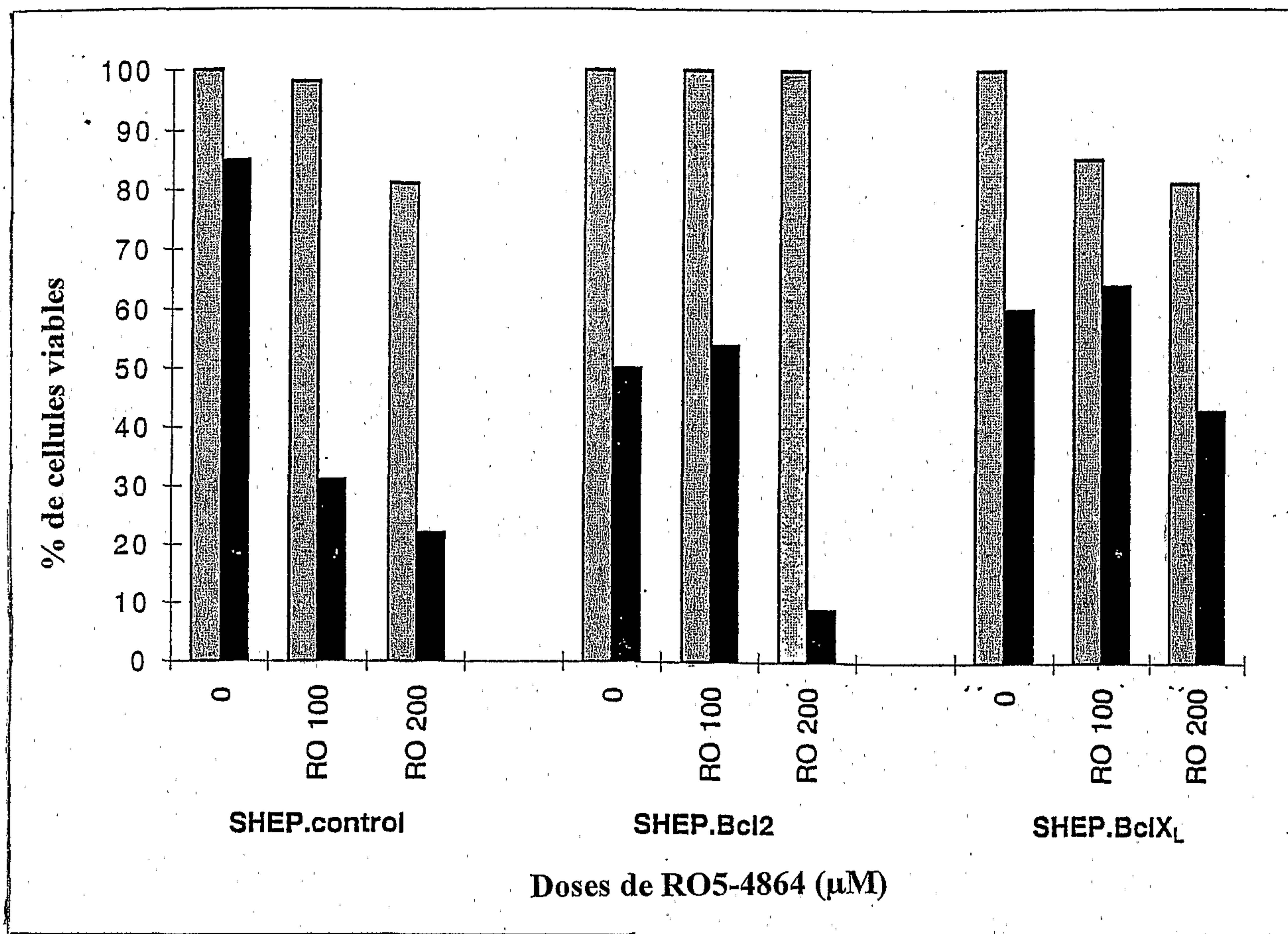


FIGURE 2

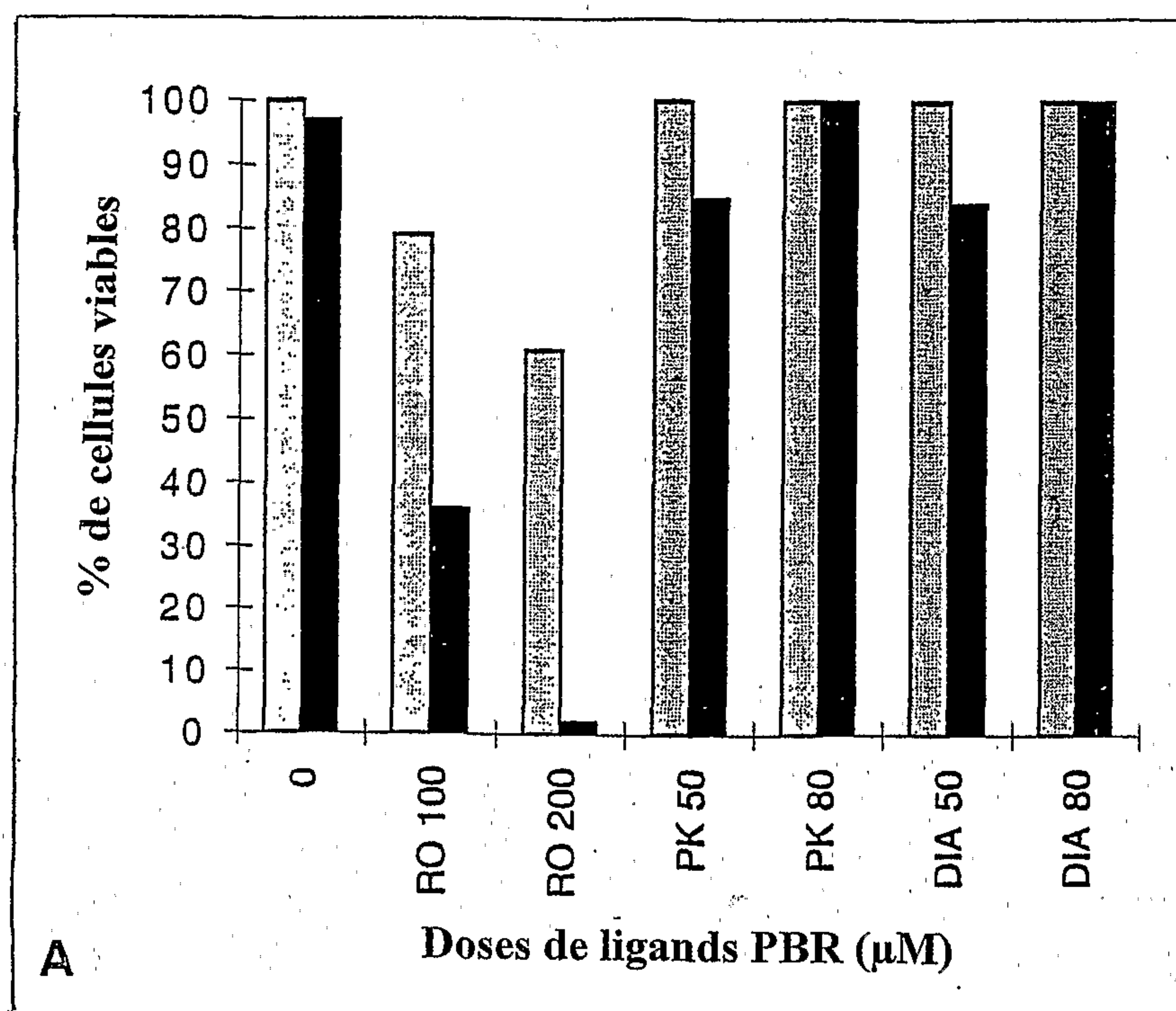


FIGURE 3

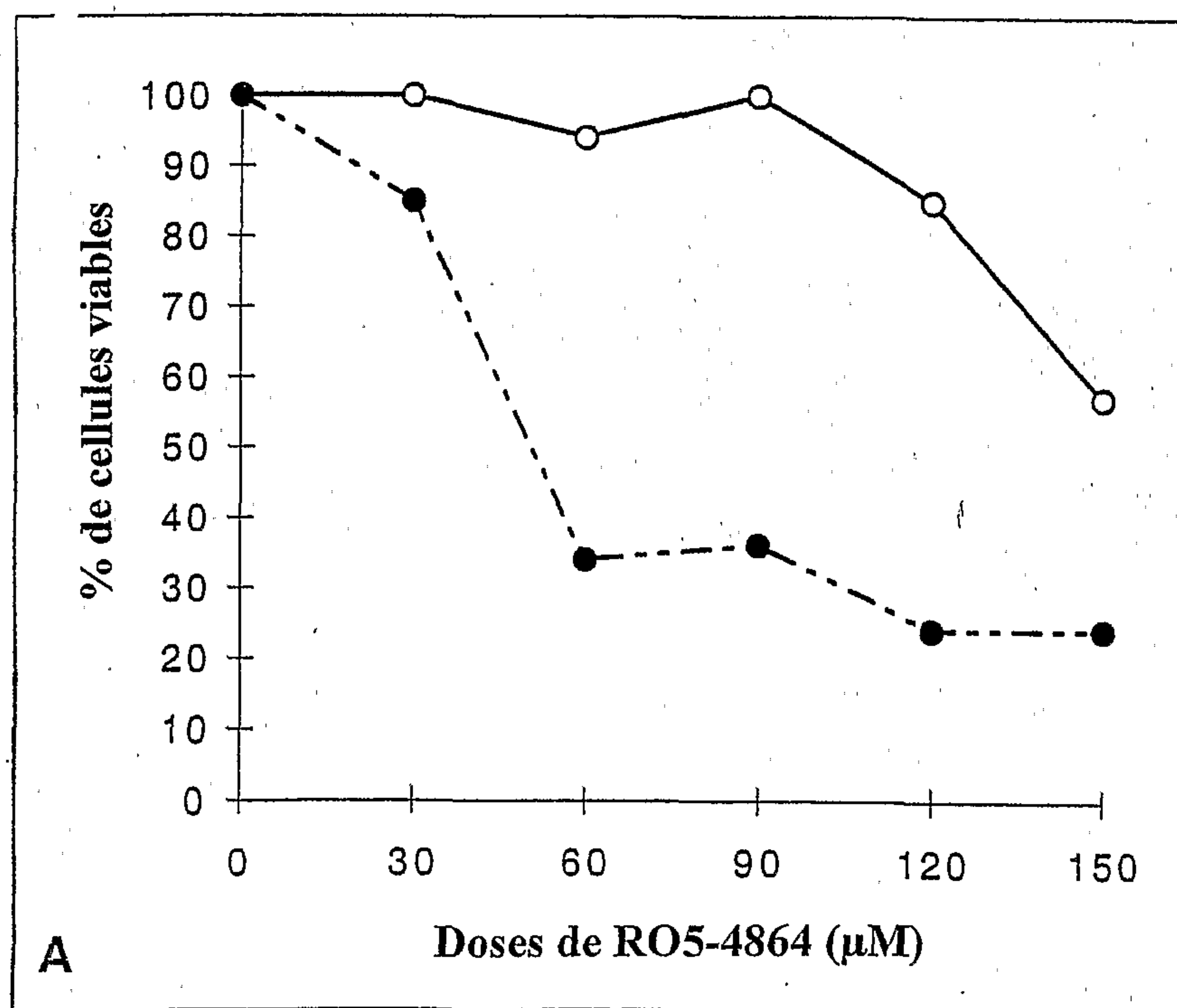


FIGURE 4

4/4

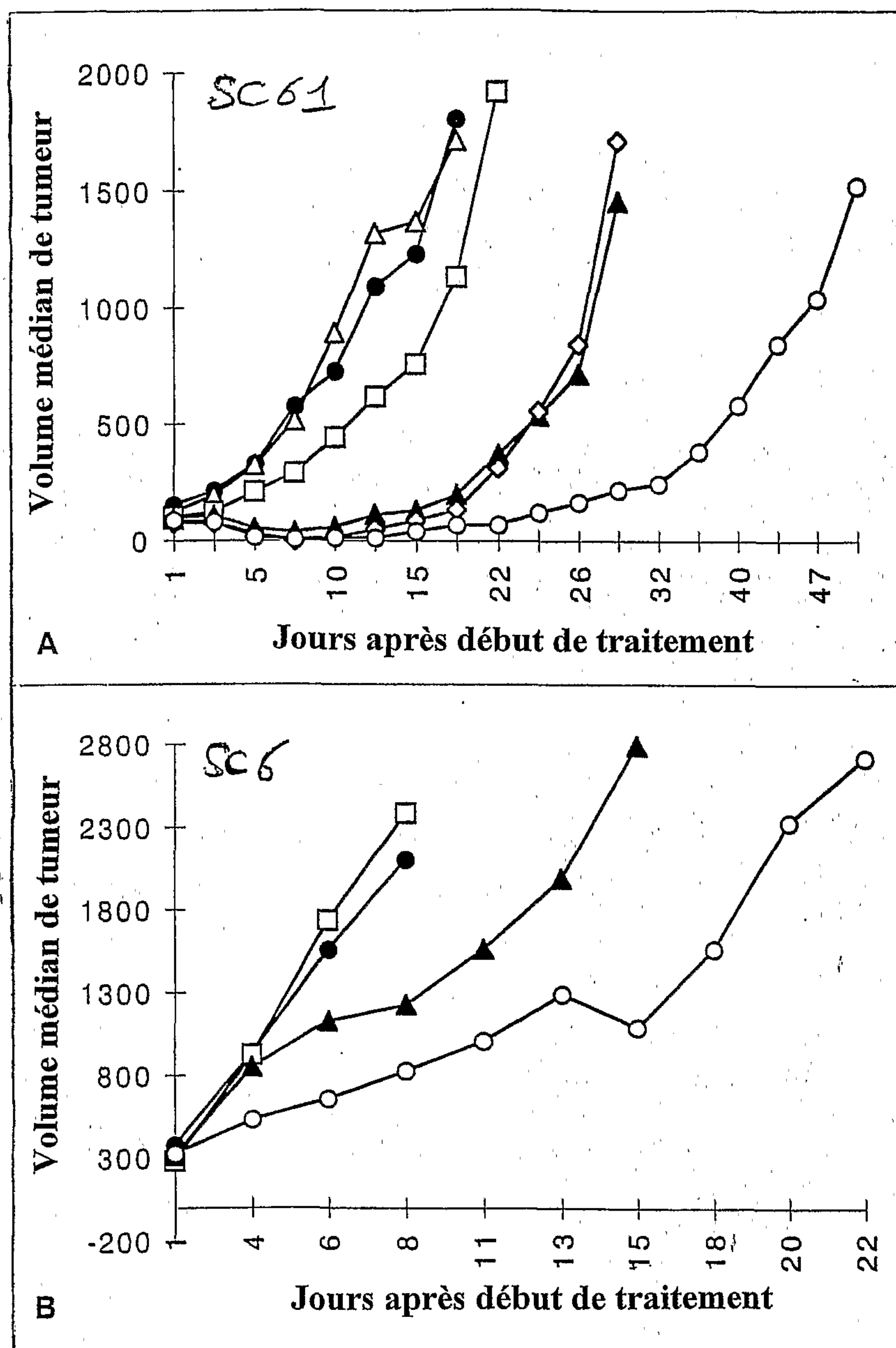


FIGURE 5