



Office de la Propriété
Intellectuelle
du Canada

Un organisme
d'Industrie Canada

Canadian
Intellectual Property
Office

An agency of
Industry Canada

CA 2683452 A1 2008/11/27

(21) **2 683 452**

(12) **DEMANDE DE BREVET CANADIEN
CANADIAN PATENT APPLICATION**

(13) **A1**

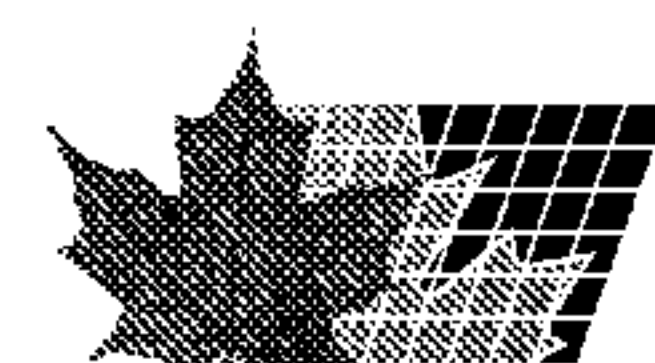
(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2008/04/18
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2008/11/27
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2009/10/07
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2008/000553
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2008/142303
(30) Priorité/Priority: 2007/04/23 (FR0702977)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *A61K 39/395* (2006.01),
A61P 35/00 (2006.01)
(71) Demandeur/Applicant:
PIERRE FABRE MEDICAMENT, FR
(72) Inventeur/Inventor:
KLINGUER-HAMOUR, CHRISTINE, FR
(74) Agent: GOUDREAU GAGE DUBUC

(54) Titre : UTILISATION D'UN ANTICORPS ANTI-CXCR4 POUR LE TRAITEMENT DU CANCER
(54) Title: USE OF AN ANTI-CXCR4 ANTIBODY FOR TREATING CANCER

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention a pour objet l'utilisation d'au moins un anticorps, ou l'un de ses fragments fonctionnels, capable de se lier à la protéine CXCR4 et ainsi d'inhiber la croissance tumorale pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du cancer. L'invention vise également une composition pour le traitement du cancer, comprenant à titre de principe actif au moins un anticorps anti-CXCR4, ou l'un de ses fragments fonctionnels, capable de se lier à la protéine CXCR4 et/ou d'inhiber son activité angiogénique et/ou proliférative. Plus particulièrement, lesdits anticorps consistent en l'anticorps MAB 173.



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international

PCT

(43) Date de la publication internationale
27 novembre 2008 (27.11.2008)(10) Numéro de publication internationale
WO 2008/142303 A3(51) Classification internationale des brevets :
A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2008/000553

(22) Date de dépôt international : 18 avril 2008 (18.04.2008)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0702977 23 avril 2007 (23.04.2007) FR(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
PIERRE FABRE MEDICAMENT [FR/FR]; 45, place
Abel-Gance, F-92100 Boulogne (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : KLINGUER-
HAMOUR, Christine [FR/FR]; Route de chez Diossaz,
Lieu-dit "Les Gotalles", F-74570 Groisy (FR).(74) Mandataire : ROUSSEAU, Pierick; Direction Propriété
Intellectuelle, Pierre Fabre S.A., 17, avenue Jean Moulin,
F-81106 Castres (FR).(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO,AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL,
PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL,
NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues(88) Date de publication du rapport de recherche
internationale: 22 janvier 2009

(54) Title: USE OF AN ANTI-CXCR4 ANTIBODY FOR TREATING CANCER

(54) Titre : UTILISATION D'UN ANTICORPS ANTI-CXCR4 POUR LE TRAITEMENT DU CANCER

(57) Abstract: The present invention relates to the use of at least one antibody, or a functional fragment thereof, capable of binding to the CXCR4 protein and thus of inhibiting tumour growth, for the preparation of a medicament for use in the treatment of cancer. The invention also relates to a composition for treating cancer, comprising, as active ingredient, at least one anti-CXCR4 antibody, or a functional fragment thereof, capable of binding to the CXCR4 protein and/or of inhibiting the angiogenic and/or proliferative activity thereof. More particularly, said antibodies consist of the MAB 173 antibody.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet l'utilisation d'au moins un anticorps, ou l'un de ses fragments fonctionnels, capable de se lier à la protéine CXCR4 et ainsi d'inhiber la croissance tumorale pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du cancer. L'invention vise également un composition pour le traitement du cancer, comprenant à titre de principe actif au moins un anticorps anti-CXCR4, ou l'un de ses fragments fonctionnels, capable de se lier à la protéine CXCR4 et/ou d'inhiber son activité angiogénique et/ou proliférative. Plus particulièrement, lesdits anticorps consistent en l'anticorps MAB 173.

WO 2008/142303 A3

UTILISATION D'UN ANTICORPS ANTI-CXCR4 POUR LE TRAITEMENT DU CANCER

La présente invention est relative à une nouvelle utilisation d'anticorps anti-
5 CXCR4 capables d'inhiber la croissance tumorale, lesdits anticorps étant notamment
monoclonaux d'origine murine, chimérique et humanisée. Selon un aspect particulier,
l'invention a pour objet l'utilisation de ces anticorps, ou de leurs fragments fonctionnels,
à titre de médicament pour le traitement prophylactique et/ou thérapeutique des cancers.
L'invention comprend enfin des produits et/ou des compositions comprenant de tels
10 anticorps en association, par exemple, avec des anticorps et/ou des agents anticancéreux
ou conjugués avec des toxines et leur utilisation pour la prévention et/ou le traitement de
certains cancers.

Le récepteur CXCR4 est un récepteur membranaire couplé aux protéines G de la
famille des récepteurs de chemokines.

15 Il existe deux isoformes du récepteur CXCR4 composées respectivement de 352 et
360 acides aminés. Le résidu Asn11 est glycosylé, le résidu Tyr21 est modifié par
l'addition d'un groupe sulfate et il existe un pont disulfure entre les Cys 109 et 186 sur la
partie extracellulaire du récepteur.

Ce récepteur est exprimé par un certain nombre de tissus sains dont les cellules
20 endothéliales, les lymphocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les « Natural
Killer » et faiblement dans le cœur, le colon, le foie, les reins et le cerveau. Le récepteur
CXCR4 est sur-exprimé dans un grand nombre de cancers dont le cancer du colon, du
sein, de la prostate, du poumon (à petites cellules et non à petites cellules), de l'ovaire, du
pancréas, du rein, du cerveau et certains lymphomes. L'expression de CXCR4 est
25 augmentée sur les cellules métastatiques *versus* les cellules cancéreuses provenant de la
tumeur primaire.

Le seul ligand connu de ce récepteur est le « Stromal-Derived Factor-1 (SDF-1) »
ou CXCL12. Celui-ci est sécrété en grande quantité par les cellules des ganglions
lymphatiques, de la moelle osseuse, du foie, du poumon et en faible quantité dans les
30 reins, le cerveau et la peau.

L'axe CXCR4/SDF-1 joue un rôle important dans le cancer car il est impliqué de
manière directe dans les phénomènes de migration cellulaire et la formation des
métastases. En effet, les cellules cancéreuses expriment le récepteur CXCR4, elle migrent

et entrent dans la circulation sanguine. Elles s'arrêtent au niveau des organes produisant de grandes quantités de SDF-1, là, elle se multiplient et forment des métastases (Murphy PM., 2001).

Il a été également montré que l'axe CXCR4/SDF-1 joue un rôle dans
5 l'angiogénèse. Plus particulièrement, il a été clairement démontré *in vitro* que le récepteur CXCR4 et son ligand SDF-1 favorisent l'angiogénèse en stimulant l'expression de VEGF-A qui à son tour augmente l'expression de CXCR4/SDF-1 (Bachelier R.E. et al., 2002).

L'intérêt de cibler les métastases en interférant avec le récepteur CXCR4 a
10 notamment été démontré *in vivo* en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre CXCR4 (Muller A. et al., 2001). En effet, dans un modèle orthotopique de cancer du sein (lignée cellulaire MDA-MB231) chez la souris SCID, un anticorps monoclonal dirigé contre CXCR4 est capable de diminuer significativement le nombre des métastases au niveau des ganglions. Une étude complémentaire (Phillips R.J et al. 2003) a également
15 montré le rôle de l'axe SDF-1/CXCR4 dans la formation des métastases dans un modèle de cancer du poumon (A549).

Par ailleurs, les macrophages associés aux tumeurs sont des composants clés des circuits inflammatoires pour la croissance des tumeurs. Les chemokines, dont SDF-1, participent au recrutement des macrophages au niveau des tumeurs. Des anticorps
20 monoclonaux capables de reconnaître le récepteur CXCR4 pourraient également réduire le recrutement des macrophages au sein des tumeurs limitant ainsi leur effet sur la croissance tumorale.

Selon un aspect général, la présente invention vise l'utilisation d'un anticorps, ou l'un de ses fragments fonctionnels, capable de se lier spécifiquement à la protéine
25 CXCR4 pour le traitement du cancer.

Les fragments fonctionnels d'anticorps selon l'invention consistent, par exemple, en des fragments Fv, scFv (sc pour simple chaîne), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc ou diabodies, ou tout fragment dont la durée de demie-vie aurait été augmentée par modification chimique, comme l'ajout de poly(alkylène) glycol tel que le
30 poly(éthylène)glycol ("PEGylation") (fragments PEGylés appelés Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG ou Fab'-PEG) (« PEG » d'après la nomenclature anglaise Poly(Ethylene) Glycol), ou par incorporation dans un liposome, microsphères ou PLGA,

lesdits fragments étant capables d'exercer de manière générale une activité même partielle de l'anticorps dont ils sont issus.

De préférence, lesdits fragments fonctionnels seront constitués ou comprendront une séquence partielle de la chaîne variable lourde ou légère de l'anticorps dont ils sont
5 dérivés, ladite séquence partielle étant suffisante pour retenir la même spécificité de liaison que l'anticorps dont elle est issue et une affinité suffisante, de préférence au moins égale à 1/100, de manière plus préférée à au moins 1/10 de celle de l'anticorps dont elle est issue.

Un tel fragment fonctionnel comportera au minimum 5 acides aminés, de
10 préférence 10, 15, 25, 50 et 100 acides aminés consécutifs de la séquence de l'anticorps dont il est issu.

De préférence, ces fragments fonctionnels seront des fragments de type Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, F(ab'), scFv-Fc ou diabodies, qui possèdent généralement la même spécificité de fixation que l'anticorps dont ils sont issus. Selon la présente invention, des
15 fragments d'anticorps de l'invention peuvent être obtenus à partir des anticorps tels que décrits précédemment par des méthodes telles que la digestion par des enzymes, comme la pepsine ou la papaïne et/ou par clivage des ponts disulfures par réduction chimique. D'une autre manière les fragments d'anticorps compris dans la présente invention peuvent être obtenus par des techniques de recombinaisons génétiques bien connues
20 également de l'homme de l'art ou encore par synthèse peptidique au moyen par exemple de synthétiseurs automatiques de peptides tels que ceux fournis par la société Applied.

Selon un aspect de l'invention, l'anticorps utilisé consiste en un anticorps monoclonal murin.

Sont également compris par anticorps selon la présente invention, les anticorps
25 chimériques ou humanisés.

Par anticorps chimérique, on entend désigner un anticorps qui contient une région variable (chaîne légère et chaîne lourde) naturelle dérivée d'un anticorps d'une espèce donnée en association avec les régions constantes de chaîne légère et chaîne lourde d'un anticorps d'une espèce hétérologue à ladite espèce donnée.

30 Les anticorps ou leurs fragments de type chimérique utilisés selon l'invention peuvent être préparés en utilisant les techniques de recombinaison génétique. Par exemple, l'anticorps chimérique pourra être réalisé en clonant un ADN recombinant comportant un promoteur et une séquence codant pour la région variable d'un anticorps

monoclonal non humain, notamment murin, selon l'invention et une séquence codant pour la région constante d'anticorps humain. Un anticorps chimérique de l'invention codé par un tel gène recombinant sera par exemple une chimère souris-homme, la spécificité de cet anticorps étant déterminée par la région variable dérivée de l'ADN murin et son
5 isotype déterminé par la région constante dérivée de l'ADN humain. Pour les méthodes de préparation d'anticorps chimériques, on pourra par exemple se référer au document Verhoeyn et al. (BioEssays, 8:74, 1988).

Par anticorps humanisé, on entend désigner un anticorps qui contient des régions CDRs dérivées d'un anticorps d'origine non humaine, les autres parties de la molécule
10 d'anticorps étant dérivées d'un (ou de plusieurs) anticorps humains. En outre, certains des résidus des segments du squelette (dénommés FR) peuvent être modifiés pour conserver l'affinité de liaison (Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986 ; Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536, 1988 ; Riechmann et al., Nature, 332:323-327, 1988).

Les anticorps humanisés ou leurs fragments fonctionnels peuvent être préparés par
15 des techniques connues de l'homme de l'art (comme par exemple celles décrites dans les documents Singer et al., J. Immun. 150:2844-2857, 1992 ; Mountain et al., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10:1-142, 1992 ; ou Bebbington et al., Bio/Technology, 10:169-175, 1992). De tels anticorps humanisés sont préférés pour leur utilisation dans des méthodes de traitement prophylactique et/ou thérapeutique *in vivo*. D'autres techniques
20 d'humanisation sont également connues de l'homme de l'art comme par exemple la technique du « *CDR Grafting* » décrite par PDL faisant l'objet des brevets EP 0 451 261, EP 0 682 040, EP 0 939 127, EP 0 566 647 ou encore US 5,530,101, US 6,180,370, US 5,585,089 et US 5,693,761. On peut également citer les brevets US 5,639,641 ou encore 6,054,297, 5,886,152 et 5,877,293.

25 Plus particulièrement, la demanderesse avance, sans vouloir être liée par une quelconque théorie, que l'utilisation d'anticorps anti-CXCR4 dans le cadre du traitement du cancer présenterait un intérêt, non pas uniquement du fait d'une inhibition de l'activité promotrice de métastase de CXCR4 comme le laisse penser l'art antérieur mais également et surtout du fait d'une action directement au niveau de la tumeur primaire.

30 En effet comme vu plus haut, il est connu de l'homme de l'art que le blocage de l'axe CXCR4/SDF-1 par un anticorps permet de diminuer significativement le nombre des métastases au niveau des ganglions (Muller et al., 2001). En outre, il est également décrit que le blocage *in vivo* de cet axe, s'il diminue significativement les métastases,

n'altère pas la taille de la tumeur primaire ni l'activité angiogénique au sein de la tumeur (Phillips RJ et al., 2003).

Par conséquent, il ressort clairement de l'art antérieur que l'utilisation d'un anticorps anti-CXCR4, i.e. capable d'interférer avec l'axe CXCR4/SDF-1, présente un
5 intérêt uniquement au niveau des métastases.

La présente invention est innovante en ce sens que, pour la première fois et contrairement aux préjugés de l'homme de l'art, elle décrit et revendique l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-CXCR4 capable non pas d'agir uniquement au niveau des métastases mais surtout d'agir directement au niveau de la croissance tumorale des
10 tumeurs primaires.

Plus particulièrement, la présente invention a pour objet l'utilisation d'un anticorps monoclonal, ou l'un de ses fragments fonctionnels, capable de se lier spécifiquement à la protéine CXCR4 pour inhiber *in vitro* et/ou *in vivo* la croissance tumorale d'une tumeur primaire.

15 La transformation cellulaire tumorale se traduit notamment par une perte de contrôle du cycle cellulaire, une insensibilité à l'apoptose des anomalies de la réparation de l'ADN. Les cancers sont alors classés selon le type de la cellule dans laquelle s'est produite la première transformation (lymphomes, carcinomes, sarcomes); cette première cellule maligne s'étant ensuite divisée, formant la tumeur primaire.
20 Certaines tumeurs primaires peuvent progresser vers un envahissement plus global de l'organisme par échappement de cellules tumorales issues de cette tumeur primaire : on parle alors de métastases.

Il faut donc bien comprendre que, dans le cadre de la présente invention, l'expression « tumeur primaire » est à mettre en opposition avec les « métastases ». La
25 tumeur primaire représentant la première étape de développement d'un cancer alors que les métastases représentent une étape différente et ultérieure vers laquelle peuvent évoluer les tumeurs primaires.

En effet, par « métastase », il faut comprendre un foyer infectieux secondaire, formé à la suite de la dissémination de cellules cancéreuses par voie sanguine ou
30 lymphatique à partir du premier foyer ou tumeur primaire.

La présente invention propose donc une alternative aux traitements existants en ce sens qu'elle apporte un traitement précoce des tumeurs primaires avant que ces dernières ne métastasent.

Par « croissance tumorale » d'une tumeur primaire, il faut comprendre l'augmentation du volume de ladite tumeur primaire, cette augmentation de volume résultant de mécanismes différents, à savoir la vascularisation, l'apoptose ou encore la prolifération cellulaire.

5 Par « vascularisation », il faut comprendre l'augmentation de la vascularisation au niveau de la tumeur primaire par angiogenèse et/ou par vasculogenèse.

L'angiogenèse consiste en la formation de nouveaux vaisseaux (néovascularisation) prenant naissance à partir d'un réseau capillaire préexistant par prolifération et migration des cellules endothéliales notamment au cours d'une
10 cicatrisation ou du développement d'une tumeur cancéreuse.

La vasculogenèse consiste en un processus par lequel des cellules endothéliales et un plexus primitif sont générés par différenciation de précurseurs des cellules endothéliales (angioblastes et hémangioblastes).

Par « apoptose », il faut comprendre le processus par lequel des cellules
15 déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal. C'est une mort cellulaire génétiquement programmée.

Par « prolifération cellulaire », il faut comprendre tout processus impliqué dans l'augmentation du nombre des cellules. Ces processus concernent d'avantage la division cellulaire faisant partie du cycle cellulaire. Plus particulièrement, la prolifération
20 cellulaire consiste en la division incontrôlée et excessive de cellules qui donne naissance à une tumeur.

La présente invention décrit donc l'utilisation d'un anticorps monoclonal tel que décrit plus haut, ou l'un de ses fragments fonctionnels, capable d'inhiber la vascularisation, c'est-à-dire l'angiogenèse et/ou la vasculogenèse, au sein de la tumeur
25 primaire.

Selon un deuxième aspect, la présente invention décrit l'utilisation d'un anticorps tel que décrit plus haut, ou l'un de ses fragments fonctionnels, capable d'inhiber la prolifération cellulaire des cellules tumorales constituant la tumeur primaire.

Selon un troisième aspect, la présente invention décrit l'utilisation d'un anticorps
30 tel que décrit plus haut, ou l'un de ses fragments fonctionnels, capable d'inhiber la vascularisation au sein de la tumeur primaire et la prolifération cellulaire des cellules tumorales constituant ladite tumeur primaire.

Enfin, selon encore un autre aspect, la présente invention décrit l'utilisation d'un anticorps tel que décrit plus haut, ou l'un de ses fragments fonctionnels, capable en outre d'induire l'apoptose des cellules tumorales constituant la tumeur primaire.

De manière préférée, l'invention consiste principalement en l'utilisation d'au moins un anticorps anti-CXCR4, ou l'un de ses fragments fonctionnels, qui consiste en un anticorps monoclonal.

Il faut entendre par « anticorps monoclonal » un anticorps issu d'une population d'anticorps sensiblement homogènes. Plus particulièrement, les anticorps individuels d'une population sont identiques à l'exception de quelques mutations éventuelles pouvant se produire naturellement qui peuvent se retrouver en proportions minimales. En d'autres termes, un anticorps monoclonal consiste en un anticorps homogène résultant de la prolifération d'un seul clone cellulaire (par exemple un hybridome, une cellule hôte eucaryote transfectée avec une molécule d'ADN codant pour l'anticorps homogène, une cellule hôte procaryote transfectée avec une molécule d'ADN codant pour l'anticorps homomgène, etc.) et qui est généralement caractérisé par des chaînes lourdes d'une seule et même classe et sous-classe, et des chaînes légères d'un seul type. Les anticorps monoclonaux sont fortement spécifiques et sont dirigés contre un seul antigène. En outre, contrairement aux préparations d'anticorps polyclonaux qui comprennent classiquement différents anticorps dirigés contre différents déterminants, ou épitopes, chaque anticorps monoclonal est dirigé contre un seul épitope de l'antigène.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, l'anticorps monoclonal utilisé est choisi parmi les anticorps MAB170 (issu du clone 12G5), MAB171 issu du clone 44708), MAB172 (issu du clone 44716) et MAB173 (issu du clone 44717) (<http://www.rndsystems.com>). Dans la présente description, chaque anticorps pourra être nommé par son nom ou par le nom de l'hybridome dont il est issu. Par exemple, l'anticorps MAB173 pourra être indifféremment nommé, notamment dans les exemples, 44717 ou MAB173 ou encore Mab173.

Le tableau 1 ci-dessous résume, de manière non exhaustive, pour chaque clone, les anticorps disponibles pour l'homme de l'art auprès de R&D Systems.

CLONE	MAB (anticorps)
12G5	MAB170
44708	MAB171
44716	MAB172
44717	MAB173

Tableau 1

5 Plus particulièrement, l'anticorps monoclonal selon l'invention consiste en l'anticorps MAB173.

La présente invention décrit donc l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-CXCR4, ou l'un de ses fragments fonctionnels, ledit anticorps monoclonal consistant en l'anticorps MAB173.

10 L'anticorps monoclonal MAB173 a été produit à partir d'un hybridome résultant de la fusion d'un myélome murin avec des cellules B isolées d'une souris ayant été immunisée avec des cellules murines 3T3 transfectée avec la protéine hCXCR4. Les IgG ont ensuite été purifiées à partir du liquide d'ascites par chromatographie d'affinité sur protéine G (Fiche technique R&D Systems concernant l'anticorps MAB173).

15 Cet anticorps est décrit comme reconnaissant spécifiquement la protéine humaine CXCR4 et ne reconnaissant pas la protéine équivalente de rat. Cet anticorps ne reconnaît pas, non plus, d'autres récepteurs aux chémokines (fiche technique R&D Systems).

Selon une forme d'exécution de l'invention, il est envisagé l'utilisation d'un anticorps telle que décrite précédemment pour la préparation d'un médicament destiné au
20 traitement et/ou à la prévention du cancer.

De manière préférée, l'utilisation des anticorps anti-CXCR4 dans le cadre du traitement et/ou de la prévention du cancer se justifie tout particulièrement dans les cancers surexprimant ce même récepteur CXCR4.

De tels cancers consistent en les cancers du colon, du sein, de la prostate, du
25 poumon (à petites cellules et non à petites cellules), de l'ovaire, du pancréas, du rein, du cerveau et certains lymphomes.

La présente invention revendique donc l'utilisation d'un anticorps tel que décrit plus haut pour le traitement du cancer, ledit cancer étant sélectionné parmi le cancer du

colon, du sein, de la prostate, du poumon (à petites cellules et non à petites cellules), de l'ovaire, du pancréas, du rein, du cerveau et certains lymphomes.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant à titre de principe actif un composé consistant en un anticorps, ou l'un de ses composés
5 dérivés ou fragments fonctionnels, de préférence additionné d'un excipient et/ou d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Plus particulièrement, l'invention vise l'utilisation d'un anticorps selon l'invention pour la préparation d'une composition pharmaceutique comprenant, en outre, au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable

10 Dans la présente description, on entend désigner par véhicule pharmaceutiquement acceptable, un composé ou une combinaison de composés entrant dans une composition pharmaceutique ne provoquant pas de réactions secondaires et qui permet par exemple la facilitation de l'administration du ou des composés actifs, l'augmentation de sa durée de vie et/ou de son efficacité dans l'organisme, l'augmentation
15 de sa solubilité en solution ou encore l'amélioration de sa conservation. Ces véhicules pharmaceutiquement acceptables sont bien connus et seront adaptés par l'homme de l'art en fonction de la nature et du mode d'administration du ou des composés actifs choisis.

De préférence, ces composés seront administrés par voie systémique, en particulier par voie intraveineuse, par voie intramusculaire, intradermique,
20 intrapéritonéale ou sous-cutanée, ou par voie orale. De manière plus préférée, la composition comprenant les anticorps selon l'invention, sera administrée à plusieurs reprises, de manière étalée dans le temps.

Leurs modes d'administration, posologies et formes galéniques optimaux peuvent être déterminés selon les critères généralement pris en compte dans l'établissement d'un
25 traitement adapté à un patient comme par exemple l'âge ou le poids corporel du patient, la gravité de son état général, la tolérance au traitement et les effets secondaires constatés.

Selon l'invention, il est décrit une composition pour le traitement du cancer, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif au moins un anticorps anti-CXCR4, ou l'un de ses fragments fonctionnels, capable de se lier à la protéine CXCR4.

30 Selon un autre aspect de l'invention, il est décrit une composition comprenant au moins un anticorps anti-CXCR4, ou l'un de ses fragments fonctionnels, ledit au moins un anticorps étant un anticorps monoclonal sélectionné parmi les anticorps MAB170, MAB171, MAB172 ou MAB173, préférentiellement l'anticorps MAB173.

Selon encore un aspect de l'invention, il est revendiquée une composition qui comprend une combinaison des anticorps cités ci-dessus, ou de leur fragments fonctionnels.

Comme vu plus haut, l'invention vise également l'utilisation d'une composition
5 comprenant au moins un anticorps tel que décrit plus haut pour le traitement du cancer du colon, du sein, de la prostate, du poumon (à petites cellules et non à petites cellules), de l'ovaire, du pancréas, du rein, du cerveau et certains lymphomes.

Bien évidemment, la liste ci-dessus n'est donnée qu'à titre illustratif et tout cancer doit être compris comme surexprimant la protéine CXCR4 et donc susceptible d'être
10 traité conformément à la présente invention. Une autre forme d'exécution complémentaire de l'invention consiste en une composition telle que décrite plus haut, caractérisée en ce qu'elle comprend, en outre, comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, au moins un agent cytotoxique/cytostatique et/ou une toxine cellulaire et/ou un radioélément.

15 On entend par "utilisation simultanée", l'administration des deux composés de la composition selon l'invention compris dans une seule et même forme pharmaceutique.

On entend par "utilisation séparée", l'administration, en même temps, des deux composés de la composition selon l'invention, compris dans des formes pharmaceutiques distinctes.

20 On entend par "utilisation étalée dans le temps", l'administration successive des deux composés de la composition selon l'invention, compris chacun dans une forme pharmaceutique distincte.

D'une façon générale, la composition selon l'invention augmente considérablement l'efficacité du traitement du cancer. En d'autres termes, l'effet thérapeutique de l'anticorps
25 selon l'invention est potentialisé de manière inattendue par l'administration d'un agent cytotoxique. Un autre avantage subséquent majeur produit par une composition selon l'invention, concerne la possibilité d'utiliser des doses efficaces en principe actif plus faibles, ce qui permet d'éviter ou de réduire les risques d'apparition des effets secondaires, en particulier l'effet de l'agent cytotoxique. De plus, cette composition selon l'invention
30 permettrait d'atteindre l'effet thérapeutique escompté plus rapidement.

Par « agents thérapeutiques anti-cancer » ou « agents cytotoxiques », il faut comprendre une substance qui, lorsqu'elle est administrée à un patient, traite ou prévient le développement du cancer chez le patient. A titre d'exemple non limitatif pour de tels

agents, il peut être mentionné les agents « alkylant », les antimétabolites, les antibiotiques anti-tumoraux, les inhibiteurs mitotiques, les inhibiteurs de fonction chromatine, les agents anti-angiogénèse, les anti-œstrogène, les anti-androgène ou les immuno-modulateurs.

5 De tels agents sont, par exemple, cités dans le VIDAL, à la page consacrée aux composés attachés à la cancérologie et l'hématologie colonne « Cytotoxiques », ces composés cytotoxiques cités par référence à ce document sont cités ici comme agents cytotoxiques préférés.

Les « agents alkylants » font référence à toute substance qui peut se coupler de
10 manière covalente ou alkyler toute molécule, préférentiellement un acide nucléique (ex. : ADN), au sein d'une cellule. Comme exemples de tels agents alkylants, il peut être cité les moutardes à l'azote comme la méchloréthamine, le chlorambucil, le melphalan, le chlorhydrate, le pipobroman, la prednimustine, le phosphate disodique ou l'estramustine ; les oxazaphosphorines comme la cyclophosphamide, l'altretamine, la trofosfamide, la
15 sulfofosfamide ou l'ifosfamide ; les aziridines ou ethylènes-imines comme le thiotepa, la triéthylèneamine ou l'altétramine ; les nitrosourées comme la carmustine, la streptozocine, la fotémustine ou la lomustine ; les sulfonates d'alkyle comme le busulfan, le tréosulfan ou l'improsulfan ; les triazènes comme la dacarbazine ; ou encore les complexes du platine comme le cisplatine, l'oxaliplatine ou le carboplatine.

20 Les « antimétabolites » font référence à des substances qui bloquent la croissance et/ou le métabolisme cellulaire en interférant avec certaines activités, généralement la synthèse d'ADN. A titre d'exemple d'antimétabolite, il peut être mentionné les methotrexate, 5-fluorouracile, floxuridine, 5-fluorodeoxyuridine, capecitabine, cytarabine, fludarabine, cytosine arabinoside, 6-mercaptopurine (6-MP), 6-
25 thioguanine (6-TG), chlorodésoxyadénosine, 5-azacytidine, gemcitabine, cladribine, deoxycoformycine et la pentostatine.

Les « antibiotiques anti-tumoraux » font référence aux composés qui peuvent prévenir ou inhiber la synthèse d'ADN, d'ARN et/ou de protéines. Des exemples de tels antibiotiques anti-tumoraux comprennent la doxorubicine, daunorubicine, idarubicine
30 valrubicine, mitoxantrone, dactinomycine, mithramycine, plicamycine, mitomycine C, bleomycine, et la procarbazine.

Les « inhibiteurs mitotiques » préviennent la progression normale du cycle cellulaire et de la mitose. En général, les inhibiteurs des microtubules ou « taxoïdes »

comme le paclitaxel et le docétaxel sont capables d'inhiber la mitose. Les alcaloïdes de vinca, comme la vinblatine, la vincristine, la vindésine et la vinorelbine sont également capables d'inhiber la mitose.

Les « inhibiteurs de fonction chromatine » ou « inhibiteurs de topo-
5 isomérases » font référence à des substances qui inhibent la fonction normale des protéines modélant la chromatine comme les topo-isomérases I et II. Des exemples de tels inhibiteurs comprennent, pour la topo-isomérase I, la camptothécine ainsi que ses dérivés comme l'irinotécan ou le topotécan et, pour la topo-isomérase II, l'étoposide, le phosphate d'étoposide et le téniposide.

10 Les « agents anti-angiogénèse » font références à toute drogue, composé, substance ou agent qui inhibe la croissance des vaisseaux sanguins. Des exemples d'agents anti-angiogénèse comprennent, sans aucune limitation, les razoxin, marimastat, batimastat, prinomastat, tanomastat, ilomastat, CGS-27023A, halofuginone, COL-3, neovastat, BMS-275291, thalidomide, CDC 501, DMXAA, L-651582, squalamine,
15 endostatine, SU5416, SU6668, interféron-alpha, EMD121974, interleukine-12, IM862, angiostatine et la vitaxine.

Les « anti-œstrogène » ou « agents anti-oestrogénique » font référence à toute substance qui diminue, antagonise ou inhibe l'action des oestrogènes. Des exemples de tels agents sont les tamoxifène, toremifène, raloxifène, droloxifène, iodoxifène,
20 anastrozole, letrozole, et l'exemestane.

Les « anti-androgènes » ou « agents anti-androgène » font référence à toute substance qui réduit, antagonise ou inhibe l'action d'un androgène. Des exemples d'anti-androgènes sont les flutamide, nilutamide, bicalutamide, sprironolactone, cyproterone acetate, finasteride et la cimitidine.

25 Les immunomodulateurs sont des substances qui stimulent le système immunitaire. Des exemples de tels immunomodulateurs comprennent les interférons, les interleukines comme l'aldesleukine, OCT-43, denileukin diflitox ou l'interleukine-2, les facteurs de nécrose tumorale comme la tasonermine, ou d'autres types d'immunomodulateurs comme le lentinan, le sizofiran, le roquinimex, le pidotimod, la
30 pégadémase, la thymopentine, le poly I :C, ou le levamisole en combinaison avec le 5-fluorouracil.

Pour plus de détails, l'homme de l'art pourra se reporter au manuel édité par l'Association Française des Enseignants de Chimie Thérapeutique intitulé « traité de

chimie thérapeutique, Vol. 6, Médicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers, édition TEC & DOC, 2003 ».

Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, ladite composition comme produit de combinaison selon l'invention est caractérisée en ce que ledit agent
5 cytotoxique est couplé chimiquement audit anticorps pour une utilisation simultanée.

Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, ladite composition selon l'invention est caractérisée en ce que ledit agent cytotoxique/cytostatique est choisi parmi les agents inhibiteurs ou stabilisateurs du fuseau, de préférence la vinorelbine et/ou la
vinflunine et/ou la vincristine.

10 Afin de faciliter le couplage entre ledit agent cytotoxique et ledit anticorps selon l'invention, on pourra notamment introduire des molécules espaceurs entre les deux composés à coupler, telles que des poly(alkylènes)glycols comme le polyéthylèneglycol, ou encore des acides aminés, ou, dans un autre mode de réalisation, utiliser des dérivés
actifs desdits agents cytotoxiques dans lesquels auront été introduites des fonctions
15 capables de réagir avec ledit anticorps selon l'invention. Ces techniques de couplage sont bien connues de l'homme de l'art et ne seront pas développées dans la présente description.

L'invention est, sous un autre aspect, relative à une composition caractérisée en ce que l'un, au moins, desdits anticorps, ou l'un de leur composé dérivé ou fragment
20 fonctionnel, est conjugué avec une toxine cellulaire et/ou un radioélément

De préférence, ladite toxine ou ledit radioélément est capable d'empêcher la croissance ou la prolifération de la cellule tumorale, notamment d'inactiver totalement
ladite cellule tumorale.

De préférence encore, ladite toxine est une toxine d'entérobactéries, notamment
25 l'exotoxine A de Pseudomonas.

Les radioéléments (ou radio-isotopes) préférentiellement conjugués à l'anticorps employés en thérapie sont des radio-isotopes qui émettent des rayons gamma et
préférentiellement l'iode¹³¹, l'yttrium⁹⁰, l'or¹⁹⁹, le palladium¹⁰⁰, le cuivre⁶⁷, le bismuth²¹⁷ et l'antimony²¹¹. Les radio-isotopes qui émettent des rayons beta et alpha
30 peuvent également être utilisés en thérapie.

Par toxine ou radioélément conjugué à au moins un anticorps, ou l'un de leur fragment fonctionnel, selon l'invention, on entend désigner tout moyen permettant de lier

ladite toxine ou ledit radioélément audit au moins un anticorps, notamment par couplage covalent entre les deux composés, avec ou sans introduction de molécule de liaison.

Parmi les agents permettant une liaison chimique (covalente), électrostatique ou non covalente de tout ou partie des éléments du conjugué, il peut être mentionné tout particulièrement le benzoquinone, le carbodiimide et plus particulièrement l'EDC (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimide hydrochloride), le dimaleimide, l'acide dithiobis-nitrobenzoic (DTNB), le N-succinimidyl S-acetyl thio-acetate (SATA), les agents dits de « bridging » présentant un ou plusieurs groupements, ayant un ou plusieurs groupements phenylaside, réagissant avec les ultraviolets (U.V.) et tout
5
10
préférentiellement le N-[4-(azidosalicylamino)butyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamide (APDP), le N-succinimid-yl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP) et le 6-hydrazino-nicotinamide (HYNIC).

Une autre forme de couplage, tout spécialement pour les radioéléments, peut consister en l'utilisation d'un chélateur d'ions bifonctionnel.

15
Parmi ces chélateurs, il est possible de mentionner les chélates dérivés de l'EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) ou du DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) qui ont été développés pour lier des métaux, particulièrement des métaux radioactifs, et des immunoglobulines. Ainsi, le DTPA et ses dérivés peut être substitué par différents groupements sur le chaîne de carbones de manière à augmenter la stabilité et la rigidité du
20
complexe ligand-métal (Krejcarek et al. (1977); Brechbiel et al. (1991); Gansow (1991); US patent 4 831 175).

Par exemple, le DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) et ses dérivés, qui a été très largement utilisé en médecine et en biologie pendant longtemps soit sous sa forme libre, soit sous la forme d'un complexe avec un ion métallique, présente la caractéristique
25
remarquable de former des chélates stables avec des ions métalliques et d'être couplé à des protéines d'intérêt thérapeutique ou diagnostique comme des anticorps pour le développement de radio-immunoconjugués en thérapie du cancer (Meases et al., (1984); Gansow et al. (1990)).

Selon encore un autre aspect, la composition selon l'invention comprend, en outre,
30
au moins un deuxième anticorps connu pour son activité anti-tumorale. A titre d'exemple non limitatif, peuvent être cités les anticorps anti Her2/neu (Herceptin), anti-EGFR (Erbix) ou encore anti-IGF-1R (7C10 ou h7C10). Bien évidemment, tout anticorps anti-tumoral pourra être dans la composition selon l'invention.

La présente invention comprend en outre l'utilisation de la composition selon l'invention pour la préparation d'un médicament.

La présente invention vise donc plus particulièrement l'utilisation d'une composition telle que décrite plus haut pour la préparation d'un médicament destiné au
5 traitement du cancer. Parmi les cancers qui peuvent être prévenus et/ou traités, on préfère le cancer du colon, du sein, de la prostate, du poumon (à petites cellules et non à petites cellules), de l'ovaire, du pancréas, du rein, du cerveau et certains lymphomes.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un anticorps selon l'invention, pour la préparation d'un médicament destiné au ciblage spécifique d'un composé
10 biologiquement actif vers des cellules exprimant ou surexprimant le récepteur CXCR4.

On entend désigner ici par composé biologiquement actif tout composé capable de moduler, notamment d'inhiber, l'activité cellulaire, en particulier leur croissance, leur prolifération, la transcription ou la traduction de gène.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de
15 la description avec les exemples et les figures dont les légendes sont représentées ci-après.

LEGENDES DES FIGURES

20 La figure 1 illustre l'étude de l'inhibition par SDF1 et l'anticorps 44717 de la liaison de [¹²⁵I]SDF1 sur membranes de cellules CHO-K1 exprimant de manière constitutive le récepteur CXCR4 humain.

La figure 2 illustre l'étude de la liaison de [³⁵S]GTPγS sur membranes de cellules CHO-K1 exprimant de manière constitutive le récepteur CXCR4 humain : influence de
25 SDF1 et de l'anticorps 44717.

La figure 3 illustre l'étude de la libération de calcium intracellulaire sur cellules intactes CHO-K1 exprimant le récepteur CXCR4 : influence de SDF1 et de l'anticorps 44717.

La figure 4 représente l'activité anti-tumorale *in vivo* de l'anticorps monoclonal
30 44717 dans le modèle de xénogreffe U-937.

La figure 5 représente l'inhibition de la croissance tumorale dans le modèle de xénogreffe MDA-MB-231 par l'anticorps monoclonal 44717.

EXEMPLES

Exemple 1 : Test d'inhibition de la liaison de [¹²⁵I]SDF-1 par l'anticorps
44717 (autrement nommé MAB173)

Méthode :

Des cellules CHO-K1 exprimant de manière constitutive le récepteur CXCR4 humain sont obtenues par transfection stable avec un vecteur d'expression contenant la totalité de la séquence codante de CXCR4 humain. Ces cellules sont cultivées dans un milieu de culture complet DMEM-Ham's F12 contenant 5 % de sérum de veau foetal (SVF) et 500 µg/ml de généticine. Les tests de liaison sont effectués sur des membranes cellulaires obtenues après grattage mécanique des cellules dans un tampon [Hepes 20mM, pH 7.4, NaCl 150mM] et récoltées par centrifugation 10000g, 15 min. La liaison de [¹²⁵I]SDF1 (activité spécifique 1500 Ci/mmol) est mesurée en milieu homogène à l'aide de billes SPA (scintillation proximity assay – GE Healthcare) en plaques 96-puits. Brièvement, les membranes (30 µg/puits) sont incubées dans le tampon de liaison [Hepes 20mM, pH 7.4, CaCl₂ 1mM, MgCl₂ 5mM, NaCl 150mM, BSA 1%] avec le composé à étudier (SDF1 ou anticorps 44717), le radioligand (1nM) puis les billes SPA-WGA-PVT (7.3 mg/puits) et incubées 1h à 25 °C. Après centrifugation [10 min. à 1000g] la radioactivité est lue dans un compteur à scintillation (TopCount, Perkin Elmer). La liaison non-spécifique de [¹²⁵I]SDF1 est déterminée en présence de 10 µM de SDF1 non marqué.

Résultats :

SDF1 inhibe de manière dose-dépendante la liaison de [125 I]SDF1 avec une valeur d'IC₅₀ (inhibition de 50 % de la liaison spécifique de [125 I]SDF1) de 25.2 ± 6.4 nM (n=6) (Fig. 1). Dans ces conditions expérimentales, l'anticorps 44717 montre une inhibition maximale de la liaison de [125 I]SDF1 de 75 % à une dose de 1 μ M et une valeur d'IC₅₀ de 44.8 ± 5.6 nM (n=3) (Fig. 1).

10 **Exemple 2 : Test de modulation de la liaison de [35 S]GTP γ S par l'anticorps 44717**

Ce test permet d'étudier la modulation de l'activation des protéines G hétérotrimériques médiée par CXCR4 et les ligands s'y fixant.

15 *Méthode :*

Des cellules CHO-K1 exprimant de manière constitutive le récepteur CXCR4 humain sont obtenues de la même manière que décrit dans l'exemple 1. Les tests de liaison sont effectués sur des membranes cellulaires obtenues après grattage mécanique des cellules dans un tampon [Hepes 20mM, pH 7.4, NaCl 150mM] et récoltées par centrifugation 10000g, 15 min. La liaison de [35 S]GTP γ S (activité spécifique 1000 Ci/mmol) est mesurée en milieu homogène à l'aide de billes SPA (scintillation proximity assay – GE Healthcare) en plaques 96-puits. Brièvement, les membranes (10 μ g/puits) sont incubées dans le tampon de liaison [Hepes 20mM, GDP 3 μ M, MgCl₂ 10mM, NaCl 100mM, EDTA 1mM, pH=7.4] avec le composé à étudier (SDF1 et/ou l'anticorps 25 44717), le [35 S]GTP γ S (0.2–0.4nM) puis les billes SPA-WGA-PVT (7.3 mg/puits) et incubées 1h à 25 °C. Après centrifugation [10 min. à 1000g] la radioactivité est lue dans un compteur à scintillation (TopCount, Perkin Elmer).

Résultats :

30 SDF1 stimule de manière dose-dépendante la liaison de [35 S]GTP γ S traduisant l'activation du récepteur CXCR4. La stimulation maximale obtenue est de 143 % par rapport à la liaison basale de [35 S]GTP γ S avec une puissance de 30.8 ± 9.7 nM (n=16)

(Fig. 2). Dans ces conditions expérimentales, l'anticorps 44717 montre une inhibition maximale de la stimulation de la liaison de [35 S]GTP γ S induite par SDF1 (10 nM) de 58 % à une dose de 300 nM et une valeur d'IC₅₀ de 20.7 ± 5.9 nM (n=4) (Fig. 2).

5

Exemple 3 : Test de mobilisation du calcium intracellulaire médié par CXCR4

Ce test permet d'évaluer la signalisation du récepteur CXCR4 par la voie de la Phospholipase C, induisant la libération de calcium intracellulaire. Ce test cinétique
10 permet de suivre l'évolution du système au cours du temps.

Méthode :

Des cellules CHO-K1 exprimant de manière constitutive le récepteur CXCR4 humain sont obtenues de la même manière que décrit dans l'exemple 1. Les cellules sont
15ensemencées en plaque 96 puits noires [100 000 cellules en milieu DMEM-F12 – SVF 5 % / puits] et sevrées sur la nuit. Les cellules sont chargées en sonde calcique fluorescente (Fluo-4 No Wash) dans le tampon [HBSS 1x, HEPS 20 mM, Probenicid acid 25 mM] durant 30 min. à 37 °C puis 30 min. à 25°C. Pour la mesure d'antagonisme, 10 μ l de solution de l'anticorps 44717 sont ajoutés sur les cellules. Après une incubation de 10
20min à température ambiante, la mesure est réalisée à l'aide du lecteur Mithras LB940 (Berthold) en mode fluorescence avec les paramètres suivants : Excitation à 485 nm, Emission à 535 nm et lampe à une énergie de 10000. Chaque puits est lu 0,1 seconde, toutes les secondes sur une période de 20 secondes (signal basal) puis 20 μ l de SDF-1 sont injectés et la lecture du puits reprend pendant 2 min. Chaque condition
25expérimentale est testée en duplicata. Les résultats sont corrigés en retranchant les valeurs d'un puits sans cellule aux valeurs des puits avec cellules. Les valeurs sont ensuite exprimées en % du signal de base et corrigées afin que la première valeur après ajout de SDF-1 soit de 100 %. Ceci permet de compenser le saut aléatoire de fluorescence induit par l'injection du ligand

30

Résultats :

SDF1 (300 nM) induit un relargage de calcium avec les cellules CHO/CXCR4, alors qu'aucune réponse n'est observée sur des cellules CHO-K1 naïves. Le signal

maximal est obtenu au bout d'environ 30 sec et l'efficacité maximale de SDF-1 est de 180 % du signal basal (Fig. 3). L'anticorps 44717 (133 nM) inhibe fortement le relargage de calcium SDF1-induit qui atteint un maximum de 130 % du signal basal au bout d'une minute après l'injection de SDF1 (Fig. 3).

5

Exemple 4 : Activité anti-tumorale de l'anticorps 44717 dans le modèle de xénogreffe U937 chez la souris NOD scid.

10 *Méthode :*

Les cellules U-937 ont été cultivées en milieu RPMI 1640 avec rouge de phénol et 4,5 g/l de glucose (Sigma, ref G8769), supplémenté de SVF 10% (F7524, Sigma) et de L-Glutamine 2 mM (BioWhittaker ref BE17-605E). Les cellules ont étéensemencées deux jours avant la greffe, elles étaient en phase exponentielle de croissance lors de
15 l'implantation chez l'animal. Dix millions de cellules U-937 P((2)+4) ont été greffées à des souris Nod/Scid femelles de 8 semaines, par injection intrapéritonéale (souche : SOPF/NOD.CB17PRKDC /J FE 6 S, NOD.CB17-Prkdc scid/J, ref NSCSSFE06S, Laboratoires Charles River).

Deux jours après la greffe les souris ont été traitées (injections en sous-cutané
20 dorsale) avec les schémas suivants :

- Groupe contrôle : PBS, deux fois par semaine
- Groupe IgG2b : IgG2b, (Sigma ref M2695, Sigma lot 046K4843, lot 22060307, 3 mg/ml), 1 mg/dose par souris, deux fois/semaine
- Groupe 44717 : Anticorps monoclonal Anti-hCXCR4 (R&D
25 Systems, ref MAB173, lot AUZ04512A, 3.43 mg/ml), 1 mg/dose par souris, deux fois/semaine

La première dose était de 2 mg par souris pour les anticorps IgG2b contrôles et l'anticorps 44717. Le choix de la voie s.c. pour le traitement a été sélectionné de façon à éviter tout contact direct entre les cellules tumorales et l'anticorps dans la cavité
30 péritonéale.

Un suivi quotidien de la survie des souris dans chaque groupe a été effectué.

Résultats :

La première souris est morte après 15 jours dans le groupe IgG2b. Toutes les souris exceptée une sont mortes dans les sept jours suivants (Fig. 4). La souris ayant survécu a été euthanasiée 82 jours après la greffe et examinée, il n'y avait pas de cellules tumorale dans sa cavité abdominale.

Dans le groupe PBS, toutes les souris exceptée une sont mortes entre les jours 17 et 21 après la greffe (Fig. 4). La dernière est morte 82 jours après la greffe.

En ce qui concerne le groupe 44717, les souris ont commencé à mourir avec un délai de 4 à 6 jours par rapport au deux autres groupes contrôles. Huit souris sont mortes entre les jours 22 et 27. Deux souris ont survécu jusqu'au jour 109, jour de leur euthanasie (Fig. 4). Une analyse statistique des résultats de survie (Kaplan-Meier) a été réalisée à l'aide du test Log-Rank (Fig. 4). L'expérience décrite ici montre que l'anticorps monoclonal 44717 dirigé contre le récepteur CXCR4 est capable d'augmenter la survie des souris dans le modèle de xénogreffe U937.

Exemple 5 : Inhibition de la croissance tumorale par l'anticorps 44717 dans le modèle de xénogreffe MDA-MB-231 chez la souris Nude athymique.

Méthode :

Les cellules MDA-MB-231 (ECACC) ont été cultivées en milieu DMEM (Invitrogen Corporation, Scotland, UK), en présence de SVF 10% (Sigma). Les cellules ont étéensemencées 60 heures avant la greffe. Elles étaient en phase exponentielle de croissance lors de l'implantation. Dix millions de cellules MDA-MB-231 (P35+18) ont été greffées en PBS à des souris Nude Athymique de 7 semaines (HARLAN). Cinq jours après l'implantation, les tumeurs étaient mesurables ($37 \text{ mm}^3 < V^3 < 44 \text{ mm}^3$) et les animaux ont été divisés au hasard en groupes de 12 souris avec des tailles de tumeurs comparables. Les souris ont été traitées par voie i.p. avec une dose d'appel d'anticorps monoclonal 44717 (lots AUZ05607A et AUZ04512A, R&D Systems) de 2mg/souris. Ensuite, les souris ont reçu, deux fois par semaine, une dose d'anticorps monoclonal 44717 de 1 mg/souris. Dans cette expérience un groupe de souris control a reçu un volume équivalent de PBS.

Le volume des tumeurs a été mesuré deux fois par semaine et calculé à l'aide de la formule suivante : $\pi/6 \times \text{longueur} \times \text{largeur} \times \text{hauteur}$.

Une analyse statistique a été réalisée pour chaque mesure à l'aide du test Mann-Whitney.

5

Résultats :

Dans le protocole 01MDAMB23101406, aucune mortalité n'a été observée durant le traitement. Comparé au groupe PBS témoin, il y a une inhibition significative de la croissance tumorale entre les jours 6 et 35 ($p \leq 0.05$) pour l'anticorps monoclonal 44717
10 administré à 1mg/dose.

Le volume tumoral moyen après 5 semaines de traitement a été réduit de 56% pour l'anticorps 44717 par rapport au PBS.

L'expérience décrite ici montre que l'anticorps monoclonal 44717 dirigé contre le récepteur CXCR4 est capable d'inhiber la croissance tumorale dans un modèle de
15 xénogreffe MDA-MB-231 chez la souris Nude athymique.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un anticorps monoclonal, ou l'un de ses fragments fonctionnels, capable de se lier spécifiquement à la protéine CXCR4 et d'inhiber *in vitro* et/ou *in vivo*
5 la croissance tumorale d'une tumeur primaire pour la préparation d'un médicament destiné au traitement et/ou à la prévention du cancer, caractérisée en ce que ledit anticorps monoclonal, ou l'un de ses fragments fonctionnels, est sélectionné parmi les anticorps MAB170, MAB171, MAB172 et MAB173.

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit anticorps
10 monoclonal, ou l'un de ses fragments fonctionnels, inhibe la vascularisation au sein de la tumeur primaire.

3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit anticorps monoclonal, ou l'un de ses fragments fonctionnels, inhibe la prolifération des cellules tumorales constituant la tumeur primaire.

15 4. Utilisation selon la revendication 2 ou 3, caractérisée en ce que ledit anticorps monoclonal, ou l'un de ses fragments fonctionnels, induit également l'apoptose des cellules tumorales constituant la tumeur primaire.

5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ledit anticorps monoclonal consiste en l'anticorps MAB173.

20 6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ledit cancer est sélectionné parmi le cancer du colon, du sein, de la prostate, du poumon (à petites cellules et non à petites cellules), de l'ovaire, du pancréas, du rein, du cerveau et certains lymphomes.

25 7. Composition comprenant au moins un principe actif capable d'inhiber *in vitro* et/ou *in vivo* la croissance tumorale d'une tumeur primaire, caractérisée en ce que ledit au moins un principe actif consiste en un anticorps monoclonal, ou l'un de ses fragments fonctionnels, capable de se lier spécifiquement à la protéine CXCR4 sélectionné parmi les anticorps MAB170, MAB171, MAB172 et MAB173.

30 8. Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce que ledit anticorps monoclonal anti-CXCR4, ou l'un de ses fragments fonctionnels, consiste en l'anticorps MAB173.

9. Composition selon l'une quelconque des revendications 7 à 8, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

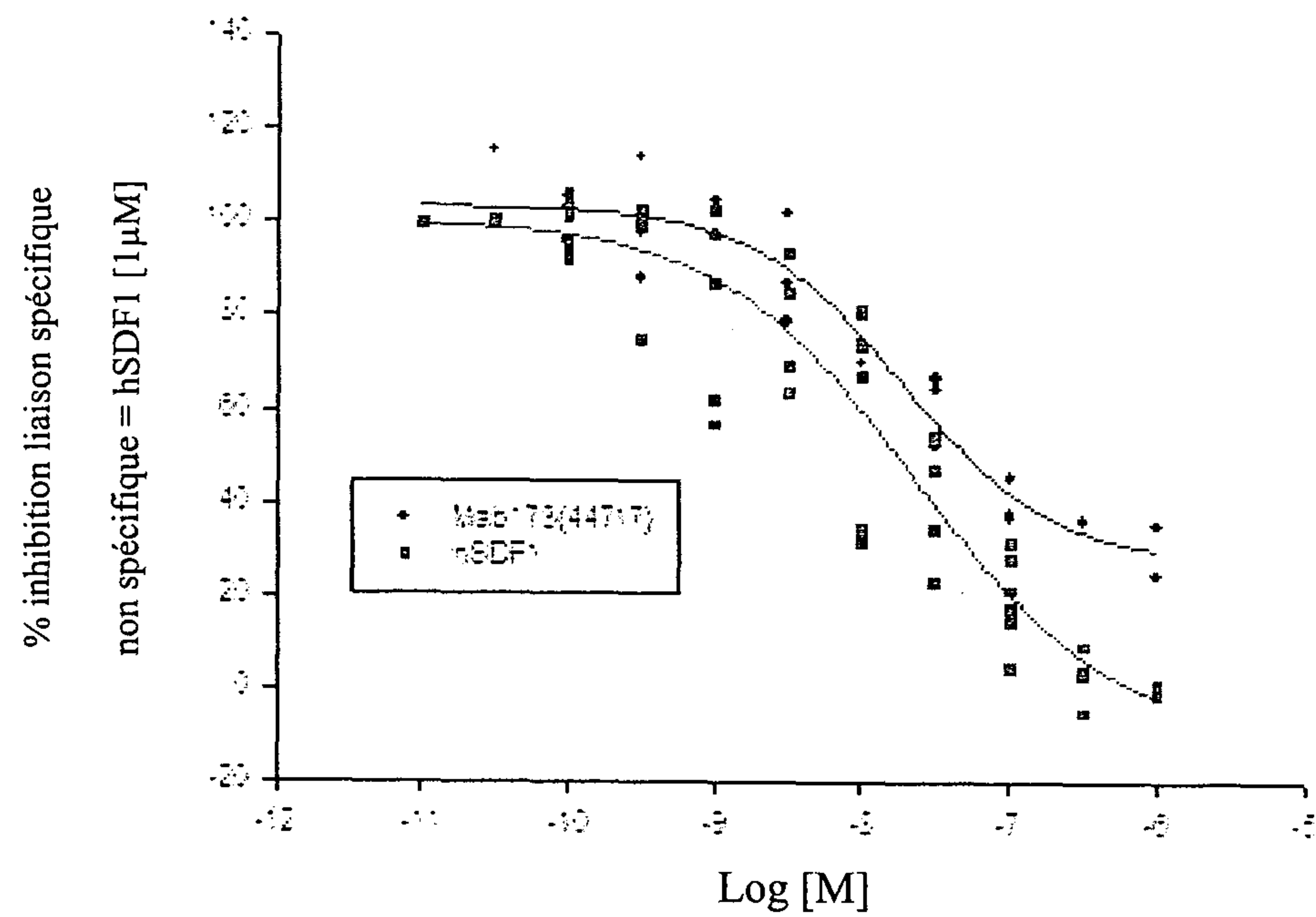
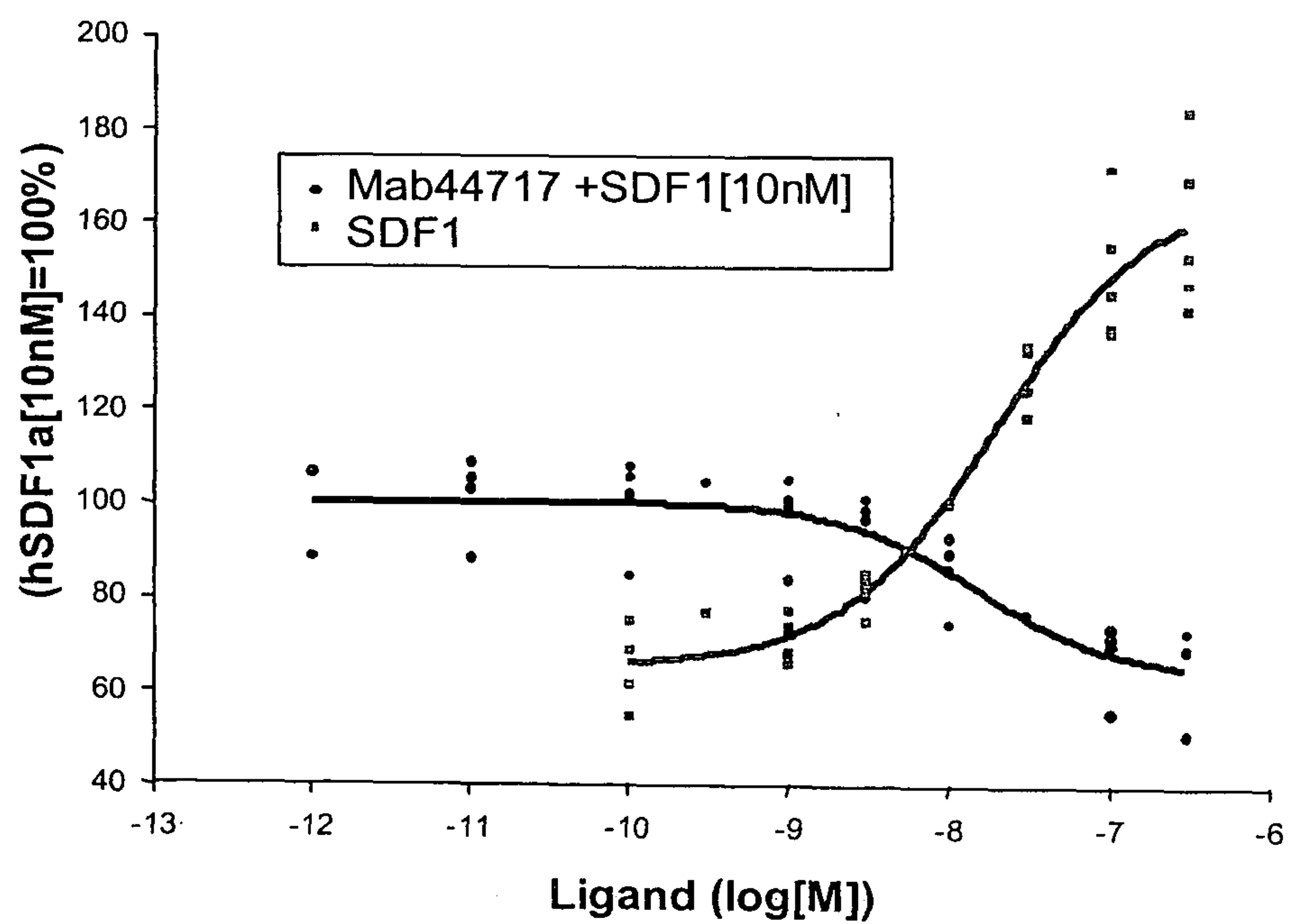
10. Composition selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, caractérisée en ce qu'elle comprend, en outre, comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, au moins un agent cytotoxique/cytostatique et/ou une toxine cellulaire et/ou un radioélément.

5 11. Composition selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisée en ce qu'elle comprend, en outre, au moins un deuxième anticorps anti-tumoral.

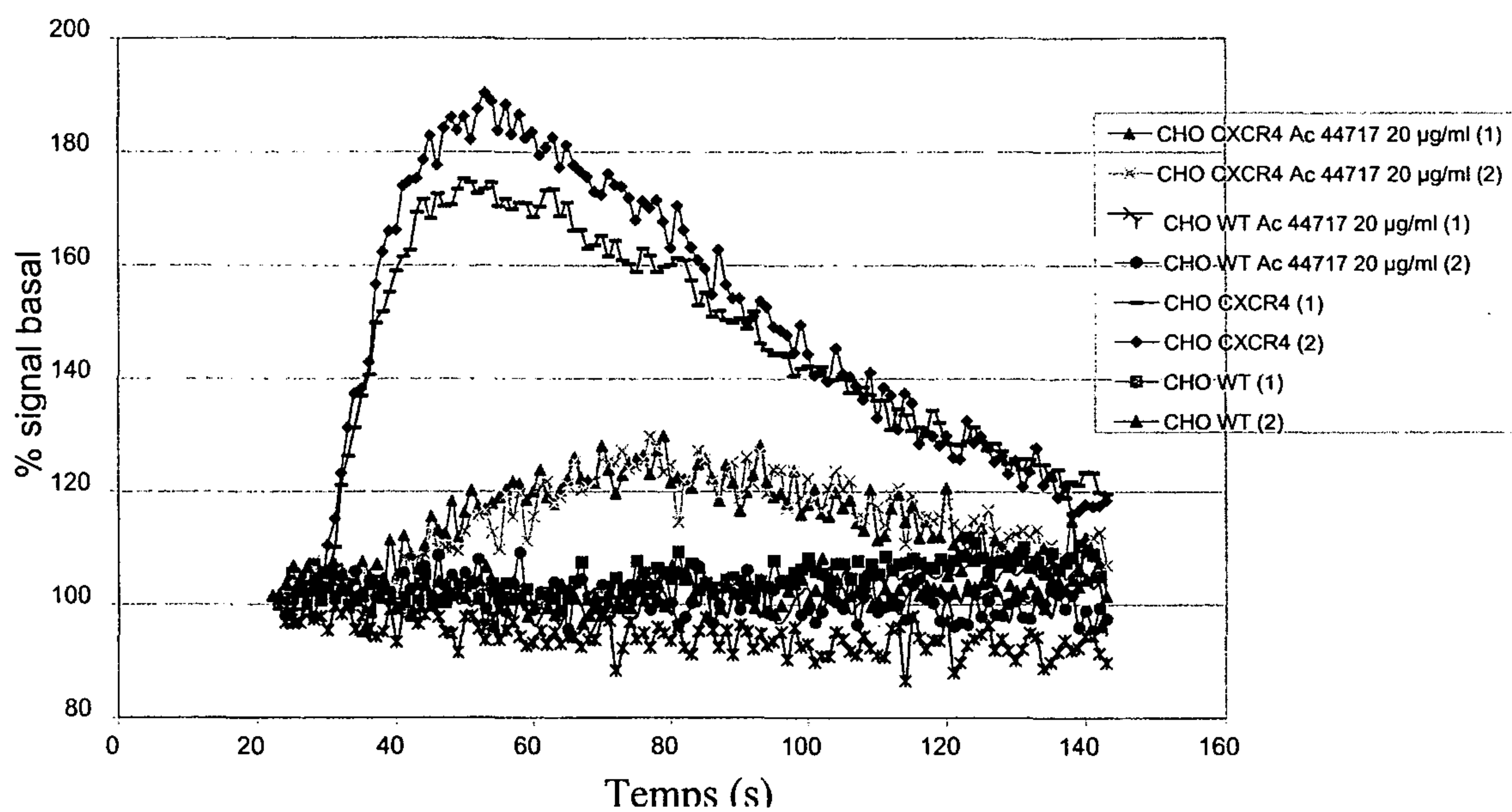
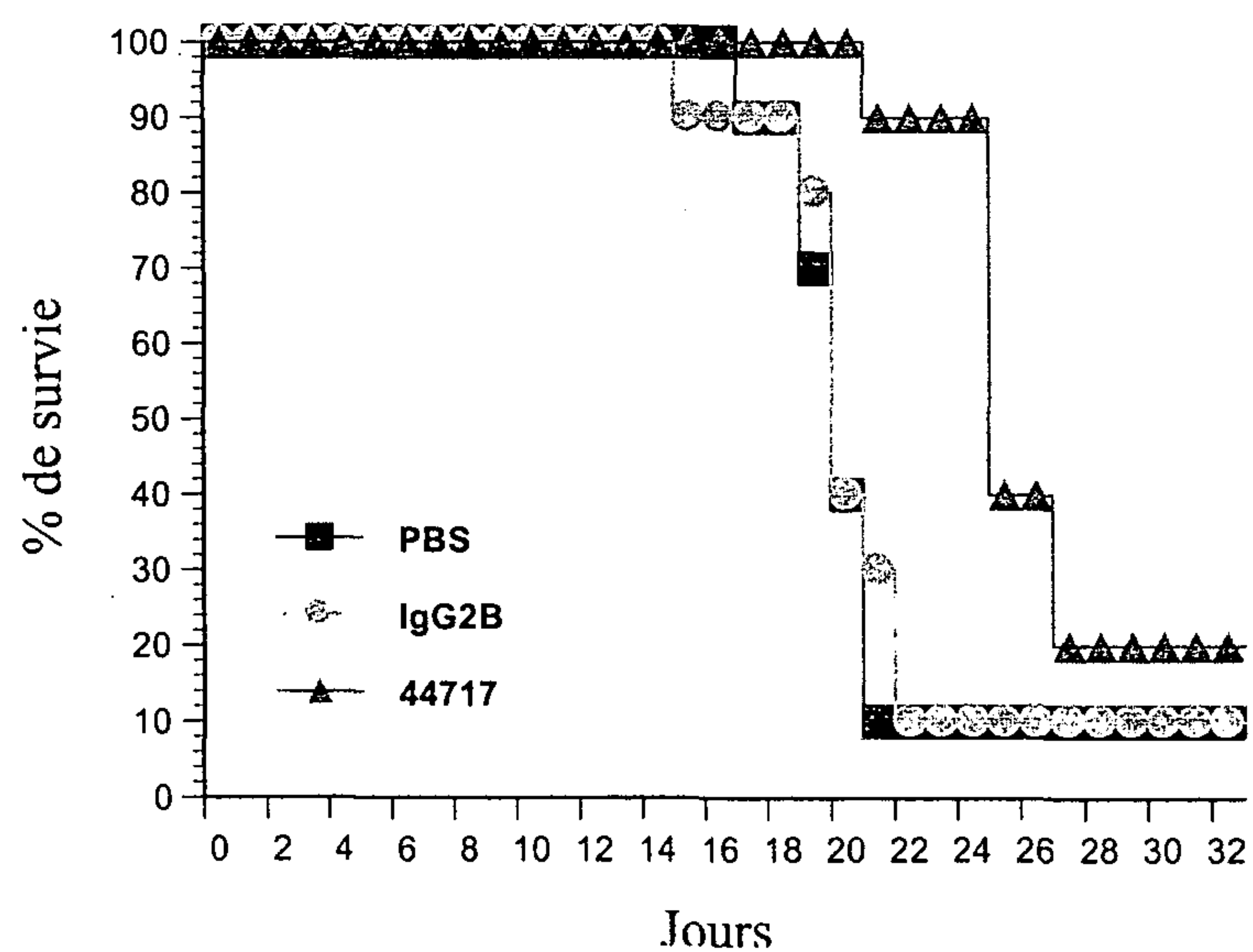
12. Utilisation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 7 à 11 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du cancer.

10 13. Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que ledit cancer est sélectionné parmi le cancer du colon, du sein, de la prostate, du poumon (à petites cellules et non à petites cellules), de l'ovaire, du pancréas, du rein, du cerveau et certains lymphomes.

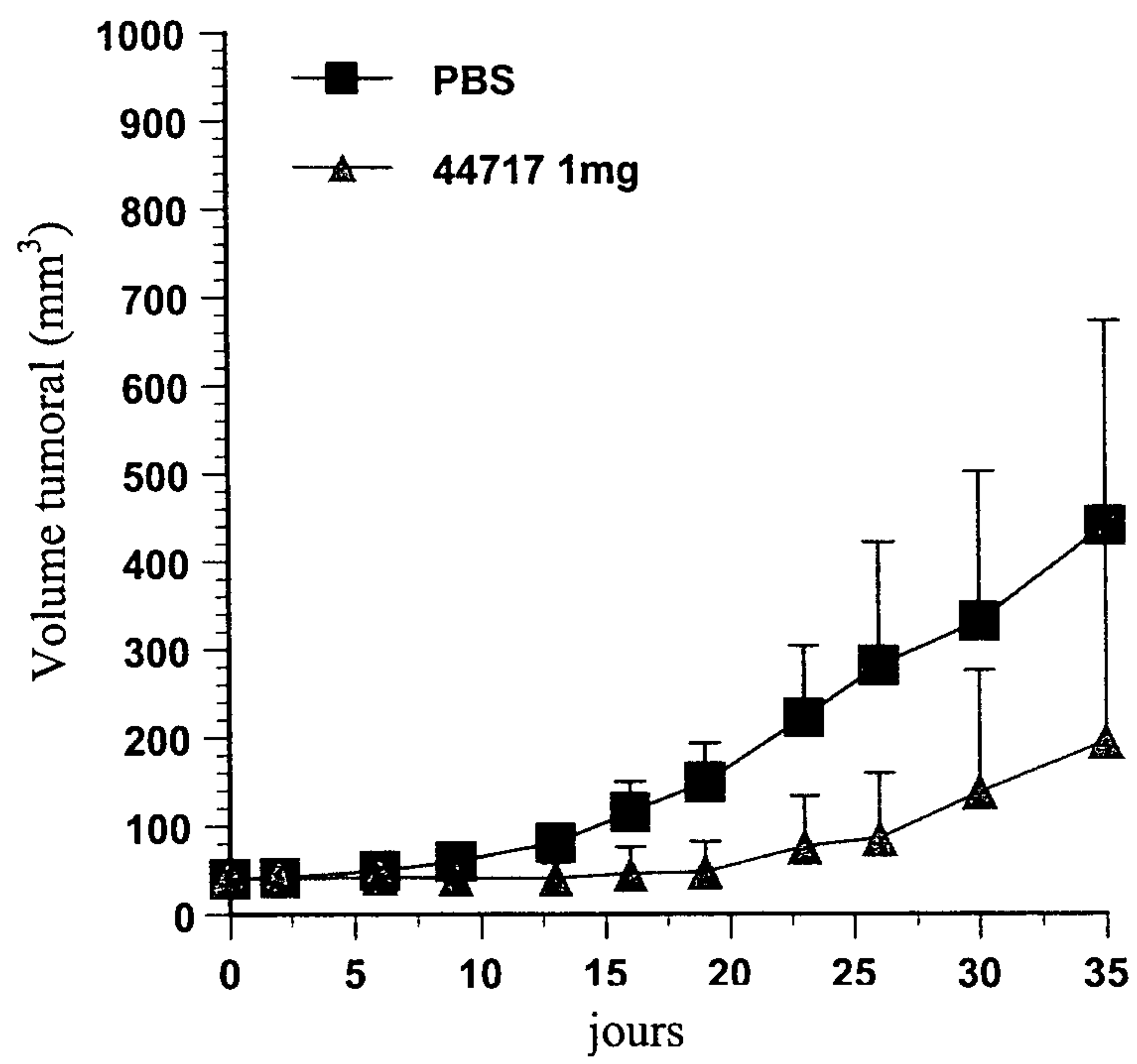
1/3

**Figure 1****Figure 2**

2/3

**Figure 3****Figure 4**

3/3

**Figure 5**