



MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

NUMERO DE PUBLICATION : 1011571A3

NUMERO DE DEPOT : 09700949

Classif. Internat. : A61K

Date de délivrance le : 09 Novembre 1999

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d'invention, notamment l'article 22;

Vu l'arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, notamment l'article 28;

Vu le procès verbal dressé le 26 Novembre 1997 à 15H00 à l'Office de la Propriété Industrielle

ARRETE:

ARTICLE 1.- Il est délivré à : HUBRIPHAR
Centre EEBIC, avenue J. Wybran 40, B-1070 BRUXELLES(BELGIQUE)

représenté(e)s par : VOSSWINKEL Philippe, GEVERS & VANDER HAEGHEN, Rue de Livourne 7, -B 1060 BRUXELLES.

un brevet d'invention d'une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : PROCEDE D'INHIBITION DE LA PRODUCTION CELLULAIRE DE CYTOKINES.

INVENTEUR(S) : Goldman Michel, avenue Joseph Jongen 17, B-1180 Bruxelles (BE); Margery Hélène, avenue des Bouvreuils 14, B-1301 Bierges (BE); Robberecht Patrick Adelin Oscar, avenue de Visé 65, B-1170 Bruxelles (BE); Tassignon Jean Pierre Robert Ghislain, avenue des Ortolans 54, B-1170 Bruxelles (BE); Vandeveldt Michel, place du Jardin aux Fleurs 3, B-1000 Bruxelles (BE)

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeurs(s).

Bruxelles, le 09 Novembre 1999
PAR DELEGATION SPECIALE :

L. WUYTS
CONSEILLER

Procédé d'inhibition de la production cellulaire
de cytokines

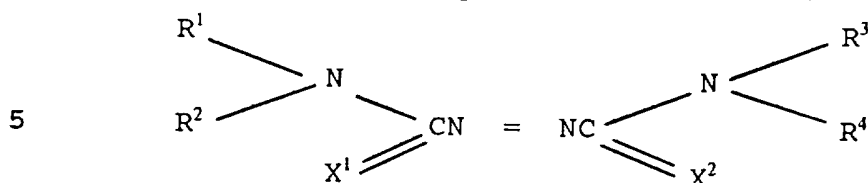
La présente invention est relative à un procédé d'inhibition de production de cytokines par des
5 cellules, notamment animales ou humaines, et de leur sécrétion.

Il est par exemple connu que les corticostéroïdes inhibent de manière globale la production des cytokines tant par les lymphocytes CD4 de type Th1 et de
10 type Th2, que par les lymphocytes CD8 (voir M. MARJORY et cons., *Inhaled beclomethazone dipropionate...*, J. Allergy Clin. Immunol. Volume 100, n° 2, September, 1997, p. 379-382; C.M. BRAUN et cons., *Corticoid modulation...*, J. Allergy Clin. Immunol., Volume 100, n° 2,
15 September 1997, p. 400-407). Ces médicaments doivent cependant, comme on le sait, être administrés avec de très grandes précautions, notamment pour éviter à l'organisme traité une surcharge en sodium, une hypertension artérielle, une hyperglycémie ou une augmenta-
20 tion de poids, entre autres.

La présente invention a pour but de mettre au point un procédé d'inhibition de production de cytokines par des cellules qui ne mette pas en danger ces cellules. Avantageusement, ce procédé permettra d'inhiber
25 chez ces cellules la production et la sécrétion de substances favorisant l'apparition de phénomènes immunoallergiques.

On résout ce problème suivant l'invention par un procédé tel que décrit au début, comprenant une

application sur lesdites cellules d'au moins un des dérivés azoïques répondant à la formule



10 dans laquelle R^1 , R^2 , R^3 et R^4 sont identiques ou différents et représentent chacun un atome d'hydrogène ou d'halogène ou un radical d'hydrocarbure aliphatique ou aromatique, éventuellement substitué, R^1 et R^2 pouvant être liés ensemble pour former un noyau hétérocyclique avec leur atome d'azote adjacent, et R^3 et R^4 pouvant être liés ensemble pour former un noyau hétérocyclique avec leur atome d'azote adjacent, X^1 et X^2 sont identiques ou différents et représentent chacun un atome
15 d'oxygène ou un groupe NR^5 , dans lequel R^5 est un atome d'hydrogène ou d'halogène, un radical d'hydrocarbure aliphatique ou aromatique, éventuellement substitué, ou un groupe nitro, et dans lequel, lorsque deux groupes NR^5 sont simultanément présents, chaque R^5 peut être
20 identique à ou différent de l'autre, ainsi que de leurs isomères.

Plusieurs de ces dérivés azoïques sont des composés connus, en particulier pour leur activité
25 antivirale, notamment contre les virus du groupe rétrovirus, en particulier le virus du SIDA (voir WO-A-9116054 et WO-A-9107876).

La préparation de la 1,1'-azobisformamidine et du 1,1'-azobisformamide a déjà été réalisée à la fin du
30 siècle passé par J. THIELE (v. The Merck Index, 10 éd. 919, Rahway, 1983; F.C. SCHMELKES et cons., N,N'-Dichloroazodicarbonamidine (azochloramid), a N-chloro derivative of the oxidant in an oxidation-reduction system, Journal of American Chemical Society, 56, 1610, 1934;
35 FR-B-2056874; US-A-3225026; US-A-3684713). Le 1,1'-

azobisformamide est connu comme adjuvant dans la farine alimentaire (US-A-2903361). Le 1,1'-azobisdiméthylformamide est également connu depuis longtemps par son action oxydante intracellulaire sur le glutathion de cellules du sang humain (N.S. KOSOWER et cons., Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide, Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 37, n° 4, 1969) ainsi que par son initiation d'un efflux de Ca^{2+} supplémentaire depuis le foie de rats perfusé (H. SIES et cons., Hepatic calcium efflux during cytochrome P-450-dependent drug oxidations at the endoplasmic reticulum in intact liver, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 78, n° 6, p. 3358-3362). Cette substance a aussi été étudiée pour son inhibition de la réparation de petites ruptures de brins d'ADN causées par irradiation de cellules en milieu hypoxique à l'aide de rayonnements ionisants (R.E. MEYN et cons., Post-radiation treatment of CHO cells..., Radiation Research, vol. 94, n° 3, 1983, p. 614; J.F. WARD et cons., Effects of Inhibitors of DNA Strand Break Repair..., Cancer Research, 44, 1984, p. 59-63). On connaît également depuis longtemps la 1,1'-azobisnitroformamidine (W.D. KUMLER, The Dipole Moments, Ultraviolet spectra and structure of azo-bis-(chloroformamidine) and azo-bis-(nitroformamidine), Journal of American Chemical Society, 75, 3092, 1953). La chloroazodine utilisée suivant l'invention est également connue depuis longtemps comme désinfectant (voir US-A-2073256 et GB-A-421006).

L'observation de l'effet de ces substances sur des cellules in vitro, puis dans des essais cliniques n'avait pas permis de comprendre leur mode d'action sur les virus VIH. Divers examens ont été entrepris dans ce but. Ils ont permis de conclure que le 1,1'-azobisformamide (ADA) n'inhibe pas la transcriptase inverse dans un

système d'essai exempt de cellules, à des concentrations CI_{90} . Un traitement simultané de cellules MT_4 avec cette substance et VIH-1 n'interfère pas sur l'intégration d'ADN proviral. De plus, l'ADA est apparu comme n'inhibant pas une transactivation Tat d'une expression de gène induit par LTR de VIH-1 (M. VANDEVELDE et cons., ADA, a potential anti-HIV drug, Aids research and human retroviruses, vol. 12, n° 7, 1996, p. 567-568; M. WITVROUW et cons., ADA, a potential anti-HIV drug, Abstract Form, Ninth International Conference on Antiviral Research Urabandai, Fukushima, Japon, Mai 19-24, 1996).

Enfin, des essais encore plus récents sur l'ADA ont montré que cette substance a un effet inhibiteur sur les protéines de type nucléocapside en provoquant un largage du zinc contenu dans les structures en "doigts de zinc" de ces protéines (W.G. RICE et cons., Azodicarbonamide inhibits HIV-1 replication by targeting the nucleocapsid protein, Nature Medicine, vol. 3, n° 3, mars 1997, p. 341-345).

Par ailleurs, il faut noter que l'absence de toxicité de l'ADA pour l'être humain est depuis longtemps connue (voir B.L. OSER et cons., Studies of the Safety of azodicarbonamide as a flour-maturing agent, Toxicology and applied Pharmacology 7, 445-472, 1965).

Un essai a déjà été effectué sur des volontaires sains. Pendant 30 jours, ils ont été traités par 1500 mg par jour d'ADA, en trois prises de 500 mg, et cela sans effet secondaire (voir WO-A-9116054, exemple 12). Des essais cliniques ont ensuite été entrepris. Dix volontaires ont pris de l'ADA durant 3 mois, aux doses de trois fois 1 g/jour le premier mois, trois fois 2 g/jour le deuxième mois et trois fois 3 g/jour le troisième mois. Aucun effet secondaire sérieux n'a été observé, si ce n'est un épisode de lithiase rénale à la

dose de 9 g/jour chez l'un des patients, à la suite d'une accumulation du catabolite du produit (la biurée) dans les reins.

Il est également connu que le 1,1'-azobisdiméthylformamide dans le traitement de cellules saines ne présente pas de toxicité vis-à-vis de celles-ci même à des concentrations relativement élevées (voir WO-A-9116054, exemples 9, a) et 10, a)). Ce même effet a été constaté pour la 1,1'-azobisformamidine (voir WO-A-9116054, exemple 8, a)) et pour le 1,1'-azobisformamide (voir WO-A-9116054, exemple 11, a)).

Enfin, il est également connu que la chloroazodine à des concentrations de 660 µg/ml ne diminue pas la viabilité de cellules saines et n'atteint pas le seuil de toxicité pour l'environnement, par évaluation de la toxicité aiguë sur le poisson (voir WO-A-9107876, exemples 6 et 12).

Il en résulte que les dérivés à utiliser offrent une toxicité propre extrêmement faible en soi vis-à-vis du corps humain ou des cellules saines traitées.

Suivant un mode de réalisation de l'invention, le procédé comprend une inhibition de production et de sécrétion d'interleukines par les cellules. Parmi le groupe des interleukines on peut citer notamment les interleukines IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12 et IL-15, et on envisage tout particulièrement l'inhibition d'IL-2 et d'IL-5.

Suivant un autre mode de réalisation de l'invention, le procédé comprend une inhibition de production et de sécrétion d'interféron-γ (IFN-γ) par les cellules. Suivant encore un autre mode de réalisation, le procédé comprend une inhibition de production et de sécrétion d'un facteur de nécrose tumorale α (TNF-α).

Suivant un mode de réalisation avantageux de l'invention, R_1 à R_5 représentent chacun dans la formule générale donnée ci-dessus un radical d'hydrocarbure aliphatique ou aromatique comportant de 1 à 6 atomes de carbone. Le dérivé azoïque suivant l'invention peut être
5 choisi parmi le groupe comprenant des dérivés d'azobisformamidine, tels que de la 1,1'-azobisformamidine, de la 1,1'-azobisnitroformamidine, de la 2,2'-azobisméthylformamidine, de la 1,1'-azobisfluoroformamidine, de la
10 1-monochloro-azobisformamidine, et de la azobis-[chloroformamidine], des dérivés d'azobisformamide, tels que du 1,1'-azobisformamide et du diméthyl-azobisformamide, et de la 1,1'-(azodicarbonyl)-dipipéridine.

Avantageusement le procédé comprend une
15 application du dérivé azoïque sur les cellules à une concentration micromolaire de 0,4 à 200, de préférence de 2 à 20, avantageusement de 2 à 10.

Suivant une forme de réalisation de l'invention, l'application d'au moins un des dérivés azoïques indiqués est effectuée sur des cellules isolées de
20 macroorganismes ou des cellules de microorganismes, qui par exemple proviennent de cultures cellulaires. Les cellules traitées peuvent aussi être celles d'un organe ou tissu multicellulaire extrait d'un corps humain ou
25 animal, comme par exemple des cellules d'un échantillon de sang ou de lymphe.

Suivant une forme de réalisation de l'invention, l'application d'au moins un des dérivés azoïques indiqués est par exemple effectuée sur des cellules
30 isolées de sang humain productrices de cytokines. Ces cellules peuvent être extraites de manière globale et dès lors on observera des effets globaux sur les différents types lymphocytaires, des cellules présentatrices d'antigènes ainsi que sur des macrophages en cocultures.
35 Une étape plus poussée de l'investigation pourra consis-

ter en la mesure de la production des cytokines par des lignées cellulaires hautement purifiées, par exemple des lymphocytes CD4.

5 Le traitement des lignées cellulaires concernées peut aussi se faire par l'administration des dérivés azoïques à des organismes vivants en ce compris l'être humain et la mesure des différents groupes de cytokines dans les liquides biologiques extraits du corps humain ou animal, avant, pendant et/ou après
10 traitement, ainsi que par la mesure de la possibilité de production des lymphokines concernées après extraction des cellules contenues dans ces liquides.

Il est connu que les lymphocytes CD4 se spécialisent pour la production spécifique de cytokines
15 et que, selon le type de cytokines produites, on différencie des lymphocytes CD4 Th1 et Th2.

Des cytokines sont aussi produites par les lymphocytes CD8(IL-4 et IL-5) mais aussi par les mastocytes et les éosinophiles et au stade d'implantation
20 dans l'utérus par les cellules ectodermiques du trophoblaste.

En ce qui concerne plus spécialement l'IL-2, cette interleukine est produite exclusivement par les cellules T. La source principale est constituée par les
25 cellules T auxiliaires et plus particulièrement les cellules auxiliaires immatures Tho et les cellules matures de type inflammatoire Th1. Des clones CD8+ peuvent également produire de faibles quantités d'IL-2. Par ailleurs, des transcrits homologues à l'ARNm de
30 l'IL-2 ont été décrits dans des cellules B hautement purifiées et dans des cellules placentaires.

En plus de cette expression spécifique de tissu, l'IL-2 est produite seulement par des cellules T activées. L'ARNm spécifique de l'IL-2 n'est pas détectable
35 ble dans les cellules T au repos, mais il est rapidement

induit après leur activation. Le contrôle transcriptionnel de l'expression de l'IL-2 a été intensivement étudié. Deux facteurs transcriptionnels sont associés à la stimulation par le récepteur T. Ce sont la protéine ubiquitaire et constitutive, Oct-1, et le complexe de protéines nucléaires appelé NF-AT ("Nuclear Factor in Activated T cells") qui constitue une cible dans l'inhibition de la synthèse de l'IL-2 par la cyclosporine A, utilisée comme médicament immunosuppresseur anti-rejet de greffe. Le taux d'IL-2 circulant augmente significativement lors de crises de rhinite allergique saisonnière. L'administration d'IL-2 a conduit à l'aggravation ou l'induction d'une pathologie immunologique qui s'est traduite de façon variée : psoriasis, pemphigus, thyroïdite, polyarthrite rhumatoïde, néphropathie à IgA, maladie de Crohn, sclérodermie.

Il est connu que l'IL-5 est produite par les lymphocytes T activés. Certains lymphomes et structures hybrides entre cellules T et lymphomes la produisent également. Cette production par les cellules T est consistante avec la notion admise de dépendance de l'éosinophilie vis-à-vis des cellules T.

La démonstration que l'IL-5, ainsi que d'autres cytokines, puissent être produites par des lignées mastocytaires, permet de considérer les mastocytes comme étant capables d'induire et/ou d'amplifier le développement d'une éosinophilie. De même, des cellules B humaines transformées par le virus d'Epstein-Barr (mononucléose infectieuse) produisent de l'IL-5. Enfin, des travaux récents ont montré la présence d'ARNm pour l'IL-5 dans les éosinophiles infiltrant la muqueuse duodéno-jéjunale de patients atteints de la maladie coeliaque, suggérant que les éosinophiles peuvent eux-même constituer une source supplémentaire d'IL-5.

L'IL-5 est impliquée dans la croissance et la différenciation des cellules B. Parmi elles, les cellules B Ly1 + (CD5+), productrices d'auto-anticorps, sont sélectivement augmentées par l'IL-5 dans des cultures de
5 moelle osseuse in vitro et in vivo.

Une activité de l'IL-5 a été démontrée dans le sérum de patients présentant une éosinophilie dans le cadre d'un syndrome hyperéosinophilique ou non, cette activité est totalement neutralisée par des anticorps
10 anti-IL5 ou l'administration de corticostéroïdes. L'éosinophilie constitue une des caractéristiques importantes de l'inflammation. Dans celle associée à l'asthme bronchique les produits de dégranulation des éosinophiles contribuent aux dommages épithéliaux
15 observés lors de cette inflammation chronique des bronches, faisant de l'éosinophile l'un des effecteurs majeur de la réaction asthmatique.

De même, dans l'inflammation allergique observée, par exemple, chez des patients atteints de
20 rhinite allergique saisonnière, il a été montré qu'après provocation allergénique, une éosinophilie locale était corrélée avec l'expression de messagers pour l'IL-5.

En ce qui concerne plus particulièrement l'interféron- γ (IFN- γ), ce sont essentiellement deux
25 populations lymphocytaires qui synthétisent et sécrètent, à l'état normal, l'IFN- γ : il s'agit des lymphocytes T et des cellules tueuses naturelles (NK) ou grands lymphocytes granuleux (LGL). C'est à la suite d'un processus d'activation par des agents inducteurs variés
30 (antigènes, mitogènes, cytokines) qu'est déclenchée la synthèse d'IFN- γ par ces cellules. Parmi les lymphocytes T (CD3+), à la fois les lymphocytes CD4+ et CD8+ chez l'homme (ou L3T4+/Lyt2- et L3T4-ILyt2+ chez la souris) produisent l'IFN- γ après activation par les alloantigènes
35 ou les mitogènes, alors que les antigènes solubles

stimulent préférentiellement sa production par les lymphocytes T auxiliaires (CD4+). Des clones lymphocytaires T spécifiques d'un antigène peuvent également produire l'IFN- γ en réponse à l'antigène.

5 Des cellules autres que leucocytaires peuvent aussi synthétiser l'IFN- γ . Il s'agit des cellules épithéliales de la couche externe (le trophoblaste) de l'embryon de porc au moment de son implantation dans la muqueuse utérine, qui expriment pendant quelques jours
10 des quantités très importantes d'IFN- γ , sans que le mécanisme déclenchant cette synthèse soit pour l'instant connu. On ne sait pas si l'embryon humain produit un tel IFN- γ .

L'IFN- γ est impliqué dans le développement de
15 divers états pathologiques et notamment dans les processus inflammatoires survenant comme conséquences de l'activation des macrophages. C'est par l'utilisation d'anticorps neutralisant les effets de l'IFN- γ in vivo que son rôle néfaste a pu être montré : l'injection
20 d'anticorps anti-IFN- γ atténue les signes cliniques liés à la malaria expérimentale de la souris, à la néphrite auto-immune des souris NZB/NZW qui représente un modèle de lupus érythémateux disséminé, au choc endotoxinique. De même l'injection d'IFN- γ accroît la gravité du
25 diabète insulino-dépendant de la souris et de la sclérose en plaque chez l'homme. Ces résultats indiquent donc que l'IFN- γ serait une composante importante intervenant dans plusieurs types de pathologies auto-immunes ainsi que dans le choc septique : ces constatations justifient
30 l'utilisation d'inhibiteurs de l'IFN- γ utilisables dans ces circonstances pathologiques ainsi que l'utilisation thérapeutique des dérivés azoïques suivant l'invention.

La substance active suivant l'invention peut être appliquée sur les cellules, seule ou en mélange
35 avec d'autres substances suivant l'invention, ou encore

en mélange avec d'autres substances ayant un autre effet sur les cellules. On peut prévoir l'application de la ou des substances actives telles quelles ou sous la forme d'une composition comportant au moins un des dérivés azoïques répondant à la formule donnée précédemment et un support ou véhicule approprié en pharmacie galénique.

La présente invention est aussi relative à l'utilisation d'au moins un des dérivés répondant à la formule donnée précédemment, ainsi que de leurs isomères, pour la fabrication de médicaments à mettre en oeuvre dans le traitement ou la prophylaxie d'affections humaines ou animales résultant d'une production cellulaire importante et anormale desdites cytokines. On peut spécialement prévoir la fabrication de médicaments pour le traitement et/ou la prévention de maladies auto-immunes, et/ou inflammatoires faisant intervenir les lymphocytes T, de maladies inflammatoires allergiques ou encore du rejet d'allogreffe et/ou de xénogreffe d'organes et de la maladie du greffon contre l'hôte après allogreffe cellulaire. Avantageusement ladite utilisation sera donc prévue pour fabriquer des médicaments destinés à être mis en oeuvre dans le traitement ou la prophylaxie d'affections telles que l'asthme, la dermatite atopique, la rhinite allergique saisonnière, le psoriasis, le pemphigus, la thyroïdite, la myasthénie, la polyarthrite rhumatoïde, la néphropathie à IgA, la sclérodermie, le lupus érythémateux, le diabète insulino-dépendant, la sclérose en plaques, les maladies inflammatoires du tube digestif, la maladie de Crohn, l'hyperéosinophilie, le syndrome éosinophile, ainsi que de toute affection due à une apoptose cellulaire médiatisée par IL-5.

Le médicament ainsi préparé suivant l'invention peut être administré par toute voie appropriée, entre autres par voie orale, sublinguale, rectale ou

vaginale, par injection ou perfusion, par voie locale, transcutanée ou transmuqueuse. Le médicament contient une quantité thérapeutiquement efficace du ou des dérivés azoïques indiqués précédemment. Le dosage sera
5 variable d'individu à individu en fonction de leurs propres caractéristiques immunologiques qui sont en partie génétiquement déterminées. Le médicament peut se présenter sous n'importe quelle forme galénique appropriée, par exemple sous la forme de gélules, de pilules,
10 de comprimés, de dragées, de poudres, de formes à injecter, de crèmes, d'onguents, de systèmes connus de distribution transdermique, de produits à inhaler.

L'invention concerne également des produits contenant au moins un des dérivés azoïques répondant à
15 la formule indiquée précédemment et de leurs isomères et au moins une cytokine, comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, dans la thérapie ou la prophylaxie d'affections humaines ou animales résultant d'une production cellu-
20 laire importante et anormale d'au moins une cytokine, différente de ladite au moins une cytokine contenue dans le produit de combinaison, ou dans la thérapie ou la prophylaxie d'affections humaines ayant pour effet secondaire une production cellulaire importante et
25 anormale d'au moins une cytokine, différente de ladite au moins une cytokine contenue dans le produit de combinaison.

L'invention va à présent être expliquée de manière plus détaillée à l'aide des exemples donnés ci-
30 dessous à titre illustratif, et non limitatif.

Les expériences décrites dans ces exemples ont été effectuées au Laboratoire d'Immunologie Expérimentale de l'Université Libre de Bruxelles.

Exemple 1

35 Effet de l'ADA sur la production de IL-5.

Des cellules mononucléaires de sang périphérique (PMBC) de 5 donneurs humains sains sont isolées d'une manière courante à partir de 50 ml de leur sang et sont ensuite purifiées par centrifugation sur gradient de densité (Lymphoprep). Les cellules ($5 \cdot 10^6$ cellules/ml) sont activées par $0,3 \mu\text{g/ml}$ de phytohémagglutinine (PHA) et mises en culture pendant 72 heures, à 37°C , en présence de diverses concentrations en ADA (20, 10, 5, 1, 0,2 et $0,04 \mu\text{g/ml}$). Le milieu de culture consiste en RPMI 1640 complété de 10% de sérum de veau foetal et de glutamine, et il contient du mercaptoéthanol. Les solutions d'ADA sont préparées dans du diméthylsulfoxyde (DMSO), la concentration de travail en DMSO pendant les expériences étant de 0,1%. Ces dernières sont réalisées sur des plaques à 96 puits ($200 \mu\text{l/puits}$) et après centrifugation des plaques à 1500 tours par minute pendant 10 minutes, les surnageants sont récoltés et analysés pour leur teneur en IL-5 par un dosage immuno-enzymatique ELISA.

Les résultats de cette expérience ressortent du tableau 1 donné ci-dessous.

Tableau 1

Teneur en IL-5 en pourcentage de l'essai témoin							
Concentration en	0	0,04	0,2	1	5	10	20
ADA ($\mu\text{g/ml}$)							
Donneur 1	100	83	54	48	44	29	9
Donneur 2	100	50	42	29	2	2	2
Donneur 3	100	58	63	57	23	28	26
Donneur 4	100	46	57	37	31	14	5
Donneur 5	100	55	58	49	34	31	7
Moyenne	100	58	55	44	27	21	10

Ces résultats montrent que, comparativement aux cellules non traitées, les PBMC des 5 donneurs testés produisent moins d'IL-5 en présence d'ADA. En moyenne, la production d'IL-5 est inhibée à 90% pour

20 $\mu\text{g/ml}$ d'ADA, à 80% pour 10 $\mu\text{g/ml}$ et à 45% pour 0,2 $\mu\text{g/ml}$.

Il faut noter que c'est la première fois qu'un effet de l'ADA est mis en évidence d'une manière tout à fait surprenante à des concentrations aussi faibles.

Des essais comparables ont été effectués en l'absence de mercaptoéthanol avec des résultats relativement semblables.

Exemple 2

Effet de l'ADA sur la production d'interféron- γ .

A partir des mêmes cultures cellulaires que celles utilisées dans l'Exemple 1, on a examiné la présence d'interféron γ après traitement aux concentrations indiquées d'ADA. Ici aussi, pour 4 donneurs sur 5, on observe une inhibition, ainsi qu'il ressort du tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2

Teneur en interféron- γ en pourcentage de l'essai témoin							
Concentration en ADA ($\mu\text{g/ml}$)	0	0,04	0,2	1	5	10	20
Donneur 1	100	62	112	87	68	23	21
Donneur 2	100	53	111	98	128	169	86
Donneur 3	100	99	70	49	62	43	40
Donneur 4	100	82	-	-	57	-	25
Donneur 5	100	38	-	-	25	-	16
Moyenne	100	67	98	78	68	78	38

Dans ces deux exemples la diminution de production des cytokines dépend de la quantité d'ADA mise en oeuvre (effet dépendant de la dose) et elle est observée pour des concentrations en ADA n'induisant pas d'effets cytotoxiques.

Exemple 3

Effet de l'ADA sur la production d'IL-2, d'IL-5 et d'interféron- γ par des lymphocytes T purifiés.

Des PBMC de 3 donneurs sains sont purifiées par centrifugation sur gradient de densité (LymphoPrep). Les lymphocytes T sont obtenus à partir de $15 \cdot 10^6$ PMBC incubées pendant 20 à 30 minutes dans un bain-marie de 37°C avec 0,8 ml d'un mélange LymphoKwik® (One Lambda, Inc., CA, USA). Celui-ci est un mélange de complément et d'anticorps spécifique pour des motifs antigéniques de la membrane des cellules qui lysent les cellules non désirées (lymphocytes B, monocytes,...). Les cellules sont centrifugées et ensuite lavées à deux reprises. Par analyse FACS on constate que les cultures de lymphocytes T ainsi produites contiennent plus de 85% de CD3 + cellules.

Ces cultures sont soumises à un traitement par diverses concentrations d'ADA. Les résultats sont donnés dans le tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3

Concentration en ADA ($\mu\text{g/ml}$)	0	1	5	10	20
En % par rapport au témoin					
IL-2 (moyenne de 2 donneurs)	100	68	27	9	3
IL-5 (moyenne de 2 donneurs)	100	67	60	40	16
IFN- γ (moyenne des 3 donneurs)	100	82	34	14	4

Exemple 4

Effet de l'ADA sur la production d'IL-2, d'IL-5 et d'interféron- γ par des lymphocytes T CD4 purifiés.

Des lymphocytes T CD4 purifiés (90% de pureté) et stimulés par du PMA (phorbol myristate acétate) + anticorps anti-CD28 de deux donneurs sains sont soumis à un traitement par diverses concentrations d'ADA. Les résultats sont donnés dans le tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4

Concentration en ADA ($\mu\text{g/ml}$)		0	1	5	10	20
En % par rapport au témoin						
5	IL-2 (moyenne des 2 donneurs)	100	82	30	18	10
	IL-5 (1 donneur)	100	69	45	43	38
	IFN- γ (moyenne des 2 donneurs)	100	73	36	15	12
10	TNF- α (1 donneur)	100	80	43	15	5

Dans les exemples 3 et 4, les résultats sont exprimés en % en considérant le milieu sans ADA comme 100%. Les concentrations correspondant à 100% sont respectivement de 90.000 pg/ml de IL-2, 1100 pg/ml de IL-5, 1900 pg/ml de IFN γ et 2735 pg/ml de TNF- α . Les résultats sont la moyenne de 2 mesures ELISA indépendantes.

On constate, pour ces donneurs, que la production d'IL-5, d'interféron- γ et de TNF- α est inhibée à la concentration de 20 $\mu\text{g/ml}$ d'ADA. Des concentrations inférieures inhibent déjà la sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes.

Il ressort de ces expériences que l'ADA agit sur la production et la sécrétion de cytokines à des concentrations d'une manière surprenante très largement inférieures à celles nécessaires pour que cette substance ait une action contre la prolifération des rétrovirus VIH dans des cellules et contre la prolifération de cellules de type cancéreux, ce qui permet d'envisager son emploi, sans problème de toxicité, dans un domaine thérapeutique dans lequel on ne pouvait pas s'attendre jusqu'à présent à son application.

Exemple 5

Gélules à administrer par voie orale.

- 17 -

Composition d'une gélule :

500 mg d'ADA

10 mg de monostéarate de glycérine

10 mg de dioxyde de silicium précipité

5 5 mg de stéarate de magnésium.

On introduit d'une manière courante cette composition dans des capsules de gélatine. On peut par exemple prévoir une administration de gélules à dose croissante (maximum 100 mg/kg/jour) à des patients qui reçoivent une greffe rénale ou autre allogreffe (coeur, poumon, foie, etc...) dans les 72 heures au plus tard précédant la transplantation, afin de diminuer ou de supprimer la phase de rejet aiguë. Un contrôle fréquent de la production d'IL-2 par les patients est recommandé.

15 Les gélules seront administrées seules ou en association avec de la cyclosporine et des corticostéroïdes ou tout autre traitement immunosuppresseur approprié.

Exemple 6

Tablettes enrobées.

20 On réalise d'une manière courante des tablettes contenant 250 mg d'azobisformamidine à l'aide des excipients suivants : hydroxypropylméthylcellulose, hydroxypropylcellulose, dioxyde de titane, polyéthylène-glycol 400, oxyde noir de fer.

25 Ces tablettes peuvent être administrées pour réduire de manière adéquate la production d'IgE grâce à la diminution d'IL-5 dans les phénomènes allergiques (rhinite allergique saisonnière par exemple). Ce traitement sera instauré afin d'obtenir une rémission et son

30 maintien.

Exemple 7

Forme à injecter.

On réalise une forme injectable à base de 1g de diméthylazobisformamide et d'eau distillée apyrogène

35 additionnée de NaCl.

Ces formes sont à administrer par exemple dans les phases de poussées aiguës de production d'autoanticorps (maladies autoimmunes, lupus erythémateux, diabète autoimmun, thyroïdite autoimmune, etc...) tout en gardant à l'esprit que l'amélioration s'observe habituellement après un délai de six à huit semaines.

Exemple 8

Crème ou onguent.

Une crème ou un onguent est réalisé avec de la 1,1'-azobis-[chloroformamidine] (choroazodine) et comme excipient, notamment de la glycérine, de l'huile de paraffine, de la vaseline.

Cette crème peut être appliquée localement à titre d'immunomodulateur dans la sclérodermie.

Exemple 9

On peut aussi prévoir des systèmes de distribution transdermique de diméthylazobisformamide.

Ces systèmes peuvent être appliqués de manière à obtenir une diminution soutenue des lymphokines circulant chez des patients souffrant d'asthme difficile à contrôler.

Ce traitement peut être combiné avec l'usage de traitements conventionnels.

Exemple 10

Comprimés à administrer par voie orale.

Composition d'un comprimé :

100 mg d'ADA

10 mg de monostéarate de glycérine

10 mg de dioxyde de silicium précipité

5 mg de stéarate de magnésium.

On introduit d'une manière courante cette composition dans une machine à comprimer.

Dans le cadre d'un traitement par exemple d'un cancer, on peut prévoir une administration d'IL-2 au patient. La teneur surabondante d'IL-2 dans le corps du

patient ainsi traité a pour effet de stimuler une surproduction par les cellules de ce dernier d'autres cytokines, et notamment d'IL-5, ce qui entraîne des effets secondaires, tels que pemphigus, thyroïdite, 5 polyarthrite rhumatoïde, maladie de Crohn, sclérodermie, hyperéosinophilie, etc....

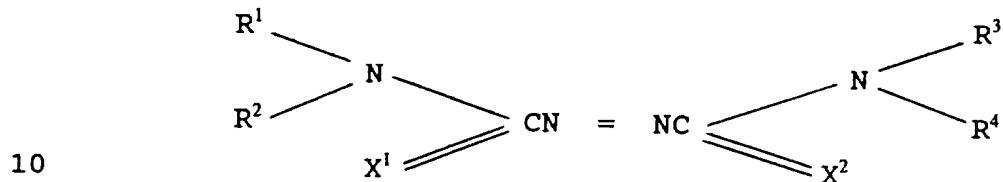
On peut par conséquent prévoir conjointement à l'administration d'IL-2, la prise régulière de comprimés d'ADA pour contrecarrer ces effets secondaires.

10 L'administration d'IL-2 et d'ADA peut se faire simultanément, séparément ou d'une manière étalée dans le temps.

15 Il doit être entendu que la présente invention n'est en aucune façon limitée aux modes et formes de réalisation donnés ci-dessus et que bien des modifications peuvent y être apportées sans sortir du cadre des revendications annexées.

REVENDICATIONS

1. Procédé d'inhibition de production de cytokines par des cellules, notamment animales ou humaines, et de leur sécrétion, comprenant une application sur ces cellules d'au moins un des dérivés azoïques répondant à la formule



dans laquelle R¹, R², R³ et R⁴ sont identiques ou différents et représentent chacun un atome d'hydrogène ou d'halogène ou un radical d'hydrocarbure aliphatique ou aromatique, éventuellement substitué, R¹ et R² pouvant être liés ensemble pour former un noyau hétérocyclique avec leur atome d'azote adjacent, et R³ et R⁴ pouvant être liés ensemble pour former un noyau hétérocyclique avec leur atome d'azote adjacent, X¹ et X² sont identiques ou différents et représentent chacun un atome d'oxygène ou un groupe NR⁵, dans lequel R⁵ est un atome d'hydrogène ou d'halogène, un radical d'hydrocarbure aliphatique ou aromatique, éventuellement substitué, ou un groupe nitro, et dans lequel, lorsque deux groupes NR⁵ sont simultanément présents, chaque R⁵ peut être identique à ou différent de l'autre, ainsi que de leurs isomères.

2. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une inhibition de production et de sécrétion d'interleukines, telles que de l'interleukine IL-2 et de l'interleukine IL-5.

3. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une inhibition de production et de sécrétion d'une cytokine choisie parmi le groupe

comprenant de l'interféron- γ et du facteur de nécrose tumorale α .

4. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que R_1 à R_5 représentent chacun un radical d'hydrocarbure aliphatique ou aromatique comportant de 1 à 6 atomes de carbone.

5. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le dérivé azoïque est choisi parmi le groupe comprenant des dérivés d'azobisformamidine, tels que de la 1,1'-azobisformamidine, de la 1,1'-azobisnitroformamidine, de la 2,2'-azobisméthylformamidine, de la 1,1'-azobisfluoroformamidine, de la 1-monochloro-azobisformamidine, et de la azobis-[chloroformamidine], des dérivés d'azobisformamide, tels que du 1,1'-azobisformamide et du diméthylazobisformamide, et de la 1,1'-(azodicarbonyl)-dipipéridine.

6. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend une application du dérivé azoïque sur les cellules à une concentration micromolaire de 0,4 à 200.

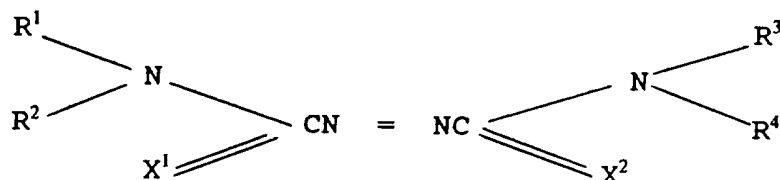
7. Procédé suivant la revendication 6, caractérisé en ce qu'il comprend une application du dérivé azoïque sur les cellules à une concentration micromolaire de 2 à 20, de préférence de 2 à 10.

8. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend l'application susdite d'une composition comportant au moins un desdits dérivés azoïques et un support approprié.

9. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend ladite application sur des cellules isolées de macroorganismes ou des cellules de microorganismes.

10. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend ladite application sur des cellules d'un organe ou tissu multicellulaire extrait d'un corps humain ou animal.

11. Utilisation d'au moins un des dérivés azoïques répondant à la formule



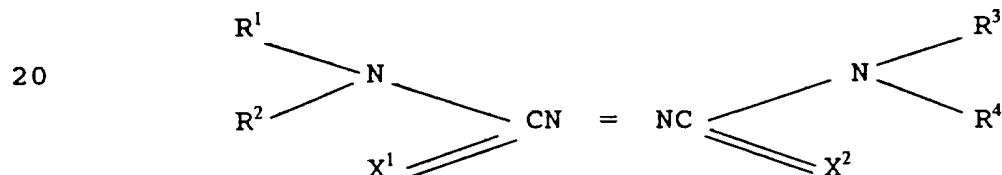
dans laquelle R^1 , R^2 , R^3 et R^4 sont identiques ou différents et représentent chacun un atome d'hydrogène ou d'halogène ou un radical d'hydrocarbure aliphatique ou aromatique, éventuellement substitué, R^1 et R^2 pouvant être liés ensemble pour former un noyau hétérocyclique avec leur atome d'azote adjacent, et R^3 et R^4 pouvant être liés ensemble pour former un noyau hétérocyclique avec leur atome d'azote adjacent, X^1 et X^2 sont identiques ou différents et représentent chacun un atome d'oxygène ou un groupe NR^5 , dans lequel R^5 est un atome d'hydrogène ou d'halogène, un radical d'hydrocarbure aliphatique ou aromatique, éventuellement substitué, ou un groupe nitro, et dans lequel, lorsque deux groupes NR^5 sont simultanément présents, chaque R^5 peut être identique à ou différent de l'autre, ainsi que de leurs isomères, pour la fabrication de médicaments à mettre en oeuvre dans le traitement ou la prophylaxie d'affections humaines ou animales résultant d'une production cellulaire importante et anormale de cytokines, à l'exception des maladies virales, notamment des infections par les virus du groupe rétrovirus.

12. Utilisation suivant la revendication 11, pour la fabrication de médicaments antiallergiques, tels que des médicaments pour le traitement et la prophylaxie

de maladies auto-immunes, inflammatoires, allergiques ou de rejets de greffe, notamment de l'asthme, de la dermatite atopique, de la rhinite allergique saisonnière, du psoriasis, du pemphigus, de la thyroïdite, de la myasthénie, de la polyarthrite rhumatoïde, de la néphropathie à Ig A, de la sclérodermie, du lupus érythémateux, du diabète insulino-dépendant, de la sclérose en plaque, de la maladie de Crohn, de l'hyperéosinophilie, du syndrome éosinophile, ainsi que de toute affection due à une apoptose cellulaire médiatisée par IL-5.

13. Utilisation suivant l'une ou l'autre des revendications 11 et 12, caractérisée en ce que le médicament ainsi fabriqué contient une quantité thérapeutiquement efficace d'au moins un desdits dérivés azoïques ou de leurs isomères ainsi qu'un support pharmaceutiquement approprié.

14. Produit contenant au moins un des dérivés azoïques répondant à la formule



dans laquelle R¹, R², R³ et R⁴ sont identiques ou différents et représentent chacun un atome d'hydrogène ou d'halogène ou un radical d'hydrocarbure aliphatique ou aromatique, éventuellement substitué, R¹ et R² pouvant être liés ensemble pour former un noyau hétérocyclique avec leur atome d'azote adjacent, et R³ et R⁴ pouvant être liés ensemble pour former un noyau hétérocyclique avec leur atome d'azote adjacent, X¹ et X² sont identiques ou différents et représentent chacun un atome d'oxygène ou un groupe NR⁵, dans lequel R⁵ est un atome d'hydrogène ou d'halogène, un radical d'hydrocarbure aliphatique ou aromatique, éventuellement substitué, ou

- 24 -

un groupe nitro, et dans lequel, lorsque deux groupes NR^5 sont simultanément présents, chaque R^5 peut être identique à ou différent de l'autre, ainsi que de leurs isomères, et au moins une cytokine, comme produit de

5 combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, dans la thérapie ou la prophylaxie d'affections humaines ou animales résultant d'une production cellulaire importante et anormale d'au moins

10 une cytokine, différente de ladite au moins une cytokine contenue dans le produit de combinaison, ou dans la thérapie ou la prophylaxie d'affections humaines ou animales ayant pour effet secondaire une production cellulaire importante et anormale d'au moins une cytoki-

15 ne, différente de ladite au moins une cytokine contenue dans le produit de combinaison.

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

Rapport de recherche de type international
établi en vertu de l'article 21 § 9
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

IDENTIFICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE		RÉFÉRENCE DU DÉPOSANT OU DU MANDATAIRE	
		OBEB 400.966	
Demande nationale belge n° 9700949		Date du dépôt 26 novembre 1997	
		Date de priorité revendiquée	
Déposant (nom) HUBRIPHAR			
Date de requête de la recherche de type international --		Numéro attribué par l'administration chargée de la recherche internationale SN 30232 BE	
I. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE (en cas de plusieurs symboles de la classification, les indiquer tous)			
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB			
Int.Cl.6: A 61 K 31/655			
II. DOMAINES RECHERCHES			
Documentation minimale consultée			
Système de classification		Symboles de la classification	
Int.Cl.6:		A 61 K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents font partie des domaines consultés			
III. <input checked="" type="checkbox"/> IL A ÉTÉ ESTIMÉ QUE CERTAINES REVENDEICATIONS NE POUVAIENT FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE		(Observations sur la feuille supplémentaire)	
IV. <input type="checkbox"/> ABSENCE D'UNITÉ DE L'INVENTION ET/OU CONSTATATION RELATIVE A L'ÉTENDUE DE LA RECHERCHE		(Observations sur la feuille supplémentaire)	

**RECHERCHE INCOMPLETE
FEUILLE SUPPLEMENTAIRE C**

Numéro de la demande

SN 30232
BE 9700949

Bien que les revendications 1 à 8 et 10 concernent une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été basée sur les effets imputés au produit/à la composition.
Les expressions "inhibition de production de cytokines par des cellules", "inhibition de production et de sécrétion d'interleukines, telles que de l'interleukine IL-2 et de l'interleukine IL-5", etc. ne représentent pas une application pharmacologique déterminée.

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Demande de recherche No

BE 9700949

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A61K31/655

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	RECHERCHE INCOMPLETE voir feuille supplémentaire C --- WO 91 16054 A (PREVISAN S.A.) 31 octobre 1991 cité dans la demande voir revendications 1-24 ---	14
X	S.SINGH ET AL.: "Protein-tyrosine phosphatase inhibitors block tumor necrosis factor-dependent activation of the nuclear transcription factor NF-kappa B" DIALOG(R) FILE 159: CANCERLIT, ACCESSION NUMBER 01132498, J BIOL CHEM, vol. 270, no. 18, 1995, pages 10631-10639, XP002073566 voir abrégé --- -/-	1-14

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche de type international a été effectivement achevée

4 août 1998

Date d'expédition du rapport de recherche de type international

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Theuns, H

C.(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	N. SATO ET AL.: "Thiol-mediated redox regulation of apoptosis. Possible roles of cellular thiols other than glutathione in T cell apoptosis" DIALOG(R) FILE 159: CANCERLIT, ACCESSION NUMBER 01125021, J. IMMUNOL., vol. 154, no. 7, 1995, pages 3194-3203, XP002073567 voir abrégé	1-14
X	--- S. DHAWAN ET AL.: "Induction of endothelial cell surface adhesion molecules by tumor necrosis factor is blocked by protein tyrosine phosphatase inhibitors: role of the nuclear transcription factor NF-kappa B" DIALOG(R) FILE 155: MEDLINE(R), ACCESSION NUMBER 09294944, EUR. J. IMMUNOL., vol. 27, no. 9, septembre 1997, pages 2172-2179, XP002073568 voir abrégé	1-14
X	--- R.W. WATSON ET AL.: "Thiol-mediated redox regulation of neutrophil apoptosis" DIALOG(R) FILE 155: MEDLINE(R), ACCESSION NUMBER 09237740, SURGERY, vol. 120, no. 2, août 1996, pages 150-157, XP002073569 voir abrégé	1-14
X	--- K.KINOSHITA ET AL.: "Reducing environment protects sinusoidal lymphocytes isolated from normal human liver from apoptosis" DIALOG(R) FILE 155: MEDLINE(R), ACCESSION NUMBER 09003147, J. HEPATOL., vol. 26, no. 1, janvier 1997, pages 103-110, XP002073570 voir abrégé	1-14
X	--- P. MARCHETTI ET AL.: "Redox regulation of apoptosis: impact of thiol oxidation status on mitochondrial function" DIALOG(R) FILE 155: MEDLINE(R), ACCESSION NUMBER 08911997, EUR. J. IMMUNOL., vol. 27, no. 1, janvier 1997, pages 289-296, XP002073571 voir abrégé --- -/--	1-14

C.(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	C. MENDEZ ET AL.: "Oxidants augment endotoxin-induced activation of alveolar macrophages" DIALOG(R) FILE 155: MEDLINE(R), ACCESSION NUMBER 08881177, SHOCK, vol. 6, no. 3, septembre 1996, pages 157-163, XP002073572 voir abrégé	1-14
X	--- P. BRENNAN ET AL.: "Inhibition of NF kappa B activity by oxidative processes in intact cells mechanism of action of pyrrolidine dithiocarbamate and diamide" DIALOG(R) FILE 155: MEDLINE(R), ACCESSION NUMBER 08615137, BIOCHEM. SOC. TRANS., vol. 24, no. 1, février 1996, page 3S XP002073573 voir abrégé	1-14
X	--- P. BRENNAN ET AL.: "The effects of thiol modifiers on the activation of NF kappa B by interleukin-1" DIALOG(R) FILE 155: MEDLINE(R), ACCESSION NUMBER 07744657, BIOCHEM. SOC. TRANS., vol. 21, no. 4, novembre 1993, page 390S XP002073574 voir abrégé	1-14
X	--- A.K. SAMANTA ET AL.: "Modification of sulfhydryl groups of interleukin-8 (IL-8) receptor impairs binding of IL-8 and IL-8-mediated chemotactic response of human polymorphonuclear neutrophils" DIALOG(R) FILE 155: MEDLINE(R), ACCESSION NUMBER 07507394, J. BIOL. CHEM., vol. 268, no. 9, 25 mars 1993, pages 6147-6153, XP002073575 voir abrégé	1-14
X	--- V.M.YATES ET AL.: "Contact dermatitis from azodicarbonamide in earplugs" DIALOG(R) FILE 155: MEDLINE(R), ACCESSION NUMBER 06072452, CONTACT DERMATITIS, vol. 19, no. 2, août 1988, pages 155-156, XP002073576 voir abrégé	1-14
X	--- J.C. NORMAND ET AL.: "Occupational asthma after exposure to azodicarbonamide: report of four cases" DIALOG(R) FILE 155: MEDLINE(R), ACCESSION NUMBER 05533800, BR. J. IND. MED., vol. 46, no. 1, janvier 1989, pages 60-62, XP002073577 voir abrégé	1-14
	--- -/--	

C.(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>Y. MAKINO ET AL.: "Thioredoxin: a redox-regulating cellular cofactor for glucocorticoid hormone action. Cross talk between endocrine control of stress response and cellular antioxidant defense system"</p> <p>DIALOG(R) FILE 159: CANCERLIT, ACCESSION NUMBER 01283496, J. CLIN. INVEST., vol. 98, no. 11, 1996, pages 2469-2477, XP002073578</p> <p>voir abrégé</p> <p>-----</p>	1-14

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande de recherche n

BE 9700949

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9116054	A	31-10-1991	AT 108065 T 15-07-1994
			AU 647100 B 17-03-1994
			AU 7481191 A 11-11-1991
			CA 2080820 A 20-10-1991
			DE 69102764 D 11-08-1994
			EP 0524961 A 03-02-1993
			ES 2060373 T 16-11-1994
			US 5585367 A 17-12-1996
			US 5399555 A 21-03-1995
