



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : G01N 1/30, A61K 31/475 G01N 33/50	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/02829 (43) Date de publication internationale: 3 février 1994 (03.02.94)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00762 (22) Date de dépôt international: 26 juillet 1993 (26.07.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/09283 28 juillet 1992 (28.07.92) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): ABRAXAS BIO LABS SA [LU/LU]; 231 Val des Bons Malades, LU-2121 Luxembourg-Kirchberg (LU). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement) : BELJANSKI, Mirko [FR/FR]; 46, boulevard de Port-Royal, F-75005 Paris (FR). (74) Mandataire: LEBOYER, Jean-Jacques; Cabinet Leboyer, 12, rue du Helder, F-75009 Paris (FR).		(81) Etats désignés: BR, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: CYTODIAGNOSIS METHOD USING ALSTONINE AS A SELECTIVE MARKER, AND DIAGNOSTIC KIT CONTAINING SAID MARKER (54) Titre: METHODE DE CYTODIAGNOSTIC UTILISANT L'ALSTONINE COMME MARQUEUR SELECTIF ET KIT DE DIAGNOSTIC CONTENANT CE MARQUEUR (57) Abstract An alstonine composition for use as a selective marker for tumour cells and/or chromosomal abnormalities, said cells or abnormalities being detected by measuring fluorescence at around 375 nm. The composition may be used to produce a diagnostic reagent for selectively detecting tumoral diseases, and in cytogenetics. Said composition is suitable for diagnosis before, during and after an operation. (57) Abrégé Composition d'alstonine, pour utilisation comme marqueur sélectif des cellules tumorales et/ou des aberrations chromoso- miques, pour la révélation de celles-ci par mesure de fluorescence à environ 375 nm. Utilisation pour l'obtention d'un réactif de diagnostic destiné à la révélation sélective des affections tumorales et en cytogénétique. Application aux diagnostics pré-, per- et post-opératoires.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NE	Niger
BE	Belgique	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NO	Norvège
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IE	Irlande	PL	Pologne
BR	Brésil	IT	Italie	PT	Portugal
BY	Bélarus	JP	Japon	RO	Roumanie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SE	Suède
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	République slovaque
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
CN	Chine	LV	Lettonie	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	MC	Monaco	TG	Togo
CZ	République tchèque	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DE	Allemagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
ES	Espagne			VN	Viet Nam
FI	Finlande				

METHODE DE CYTODIAGNOSTIC UTILISANT L'ALSTONINE COMME MARQUEUR
SELECTIF ET KIT DE DIAGNOSTIC CONTENANT CE MARQUEUR

La présente invention concerne les techniques de cytodiagnostics.

5 Elle concerne plus particulièrement la détection des tumeurs, notamment pour l'établissement d'un diagnostic tumoral, et celle des aberrations chromosomiques, au moyen d'alstonine avec un procédé de révélation sélective par fluorescence.

10 Dans la présente description on entend par cytodiagnostics aussi bien le diagnostic des affections tumorales que la cytogénétique.

L'alstonine est un alcaloïde extrait de *Rauwolfia vomitoria*, *Rauwolfia obscura* et *Vinca rosea*, ainsi que
15 d'autres apocynacées. Elle appartient au groupe des bêta-carbolines quaternaires. Des procédés d'extraction de cet alcaloïde ont été décrits par M. Beljanski et J. Bugiel dans les documents FR-A-78 30663 et EP-A-0 059 817, dont le contenu est incorporé ici par référence. Il a également
20 été montré que cet alcaloïde présente une fluorescence très vive et bleu pâle, correspondant par analyse au moyen d'un spectrophotomètre à deux maxima d'absorption, respectivement à 252 et à 308 nm, caractéristiques de l'alstonine et de son isomère, la serpentine.

25 Il a également été montré, notamment dans les documents susdits, que l'alstonine possède des propriétés anti-cancéreuses désormais bien établies sur les cellules ascitiques du lymphome YC8 de la souris, sur des tumeurs "ascites" d'Ehrlich chez la souris, sur des cellules
30 cancéreuses en culture de type KB, HELA, HEP II et L et sur des cellules provenant de néphro-blastome, de neuroblastome ou de tératome, qui sont toutes des tumeurs humaines en cultures primaires dont l'alstonine s'est avérée assurer la destruction totale en 24/48 heures. A
35 titre de comparaison, afin de bien établir la sélectivité de l'action de l'alstonine à cet égard, la même dose

d'alstonine (200 µg par ml de culture) a été appliquée à des cultures de cellules primaires de reins de singe ou sur des cellules de lignées de type Véro ou Circ; elle n'a produit dans les 8 jours aucune destruction cellulaire.

5 Cela attestait de l'interaction spécifique de l'alstonine avec l'ADN des cellules tumorales, alors que l'ADN des cellules normales n'était pas affecté par cet alcaloïde.

Il était cependant encore délicat de bien maîtriser un traitement antitumoral utilisant un tel
10 alcaloïde et/ou de pouvoir donner un diagnostic sérieux de l'état d'un patient aux stades pré-, per- et post-opératoires.

Il existait donc un besoin pour un moyen d'évaluation des affections tumorales destiné à faciliter
15 le diagnostic des lésions cancéreuses et des métastases et à en améliorer le traitement.

On a maintenant trouvé de manière inattendue que l'alstonine elle-même, utilisée en une concentration appropriée dans des compositions mises sous une forme
20 convenant à des applications in vitro ou in vivo, permet, par révélation appropriée de sa bioluminescence après son incubation, d'obtenir un diagnostic sélectif des affections tumorales, tant pour ce qui concerne leur localisation que pour l'appréciation de leur ampleur. On a
25 également trouvé qu'une composition d'alstonine analogue est utile en cytogénétique. L'alstonine s'est en effet avérée présenter un spectre de fluorescence centré sur la longueur d'onde 446 nm, tandis que son spectre d'excitation de la fluorescence et son spectre
30 d'absorption présentaient tous deux des maxima au nombre de trois, correspondant respectivement aux longueurs d'onde de 252 nm, 310 nm et 375 nm.

L'invention a donc pour premier objet une composition d'alstonine, pour utilisation comme marqueur
35 sélectif des cellules tumorales et/ou des aberrations

chromosomiques, pour la révélation de celles-ci par mesure de fluorescence à environ 375 nm.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'une composition d'alstonine pour l'obtention d'un réactif de cytodiagnostics destiné à la révélation sélective des affections tumorales et/ou des aberrations chromosomiques.

Elle a encore pour objet une méthode d'évaluation des tumeurs et/ou de cytogénétique, utile pour le diagnostic des affections tumorales et des aberrations chromosomiques, comprenant la révélation des cellules tumorales par fluorescence sélective détectée au moyen d'une activation par une lampe de Wood émettant à environ 375 nm ou d'une détection au microscope à fluorescence à environ 375 nm, après fixation sélective d'une quantité appropriée d'une telle composition pharmaceutique et incubation.

Un autre objet de l'invention est un kit ou une trousse pour faciliter le diagnostic des affections tumorales et/ou des aberrations chromosomiques, comportant notamment une composition comprenant de l'alstonine sous une forme galénique appropriée.

On a en effet pu établir qu'une solution d'alstonine à 5.10^{-6} M excitée aux trois longueurs d'ondes de 260, 310 et 375 nm donne une fluorescence dans le domaine du visible (446 nm) avec des rendements quantiques différents d'un maximum à l'autre. L'émission la plus forte correspond au maximum à 310 nm.

Le spectre d'absorption dans l'U.V. a donné trois bandes d'absorption vers respectivement 260, 310 et 320 nm.

Le rendement quantique, qui mesure le rapport entre l'intensité émise et l'intensité d'excitation, permet de classer ces maxima selon leur efficacité. L'efficacité maximale est obtenue pour une excitation à 310 nm; le rendement est plus faible, mais encore très

voisin, pour 375 nm; en revanche il est très inférieur pour la radiation à 260 nm.

Mais les propriétés usuelles d'absorption lumineuse présentées par les fibres optiques font qu'il n'était pas possible d'envisager d'utiliser l'excitation de la fluorescence à 260 nm pour une utilisation avec endoscope. De même on ne pouvait envisager d'utiliser la longueur d'onde de 310 nm, car les verres employés dans les appareillages de détection de fluorescence ne sont transparents qu'au-delà de 360 nm. Aussi est-ce grâce à la mise en évidence d'une longueur d'onde d'excitation efficace à 375 nm que l'on a pu envisager une telle application de révélation par fluorescence.

On a au surplus pu établir que, à intensité d'excitation constante, il existe une relation linéaire entre l'intensité de fluorescence et la concentration en alstonine. Cela s'est vérifié tout particulièrement dans un domaine de concentration en alstonine suffisant pour la détection de l'alstonine, mais suffisamment faible pour que soient minimisés les risques de toxicité du produit vis-à-vis des cellules saines.

L'invention est décrite plus en détail ci-après en référence aux figures annexées, dans lesquelles:

- Fig. 1 représente les spectres d'excitation et d'émission de l'alstonine;

- Fig. 2 représente le spectre d'absorption de l'alstonine;

- Fig. 3 A représente la variation de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en alstonine; Fig. 3 B et Fig. 3 C sont des tracés montrant que cette variation est linéaire dans le domaine de concentration en alstonine de 10^{-6} à 10^{-5} ;

- Fig. 4 A à 4 D montrent les résultats de l'analyse de quelques grandeurs physico-chimiques de l'alstonine mise à incuber selon l'invention dans deux

populations cellulaires SK0 et ST3, effectuée au moyen d'un analyseur d'image par fluorescence;

- Fig. 5 A à 5 C représentent schématiquement les résultats d'une chromatographie sur gel de Sephadex, avec
5 élution avec du tampon tris-HCl 10 mM, pH 7,5.

Comme il a été dit plus haut, le spectre de fluorescence de l'alstonine est centré sur la longueur d'onde de 446 nm (Fig. 1), tandis que le spectre d'excitation de la fluorescence (Fig. 1) et le spectre
10 d'absorption (Fig. 2) se sont avérés présenter trois maxima correspondant respectivement aux longueurs d'onde de 252 nm, 310 nm et 375 nm.

Ainsi que le montrent les résultats consignés sur les figures 3 A à 3 C, l'intensité de fluorescence de
15 l'alstonine et la concentration en cet alcaloïde sont dans une relation linéaire entre elles, à intensité d'excitation constante, dans un domaine de concentration en alstonine approprié pour la détection par les appareillages classiques en spectrofluorimétrie.

20 Par ailleurs des études effectuées par chromatographie sur colonnes de gel de Sephadex (Fig. 5 A à Fig 5 C) ont montré qu'il n'y a aucune interaction entre l'ADN double brin ou l'ADN simple brin isolés des cellules normales et l'alstonine. Ces résultats sont en accord avec
25 les publications sur l'alstonine précisant que celle-ci ne s'accumule que dans les cellules tumorales en raison de son interaction avec l'ADN tumoral [voir en particulier à ce sujet: M. Beljanski et M.S. Beljanski, Exp. Cell. Biol., S. Karger AG, Bâle, Pub. 50: 79-87 (1982) et M.
30 Beljanski et M.S. Beljanski, Oncology, S. karger AG, Bâle, Pub. 43: 198-203 (1986)].

Quant aux études d'accumulation de l'alstonine réalisées sur des cellules vivantes en culture soit normales (ST3) soit tumorales (SK0), elles montrent (Fig.
35 4 A à 4 D) que, après une incubation d'environ 20 minutes ou plus en présence du produit, les études de fluorescence

conduites avec un analyseur d'image Samba 2000 révèlent une accumulation importante uniquement dans les cellules SK0.

Pour la mise en oeuvre des moyens et de la méthode selon la présente invention, il convient dans la pratique d'utiliser de l'alstonine en solution aqueuse à raison d'environ 0,2 à 5 mg/20 ml d'eau, soit à une concentration d'environ 1 à 25% en poids/volume, dans les applications in vitro..

Pour la constitution d'un kit ou trousse de diagnostic utilisable principalement dans des tests in vitro, il est recommandé d'utiliser comme matière première une solution aqueuse purifiée d'alstonine à saturation et d'en effectuer extemporanément des dilutions à l'eau pure pour analyses à des concentrations utiles, variant en pratique entre environ 5 et 10% en poids/volume.

In vivo il convient en pratique d'administrer l'alstonine sous une forme galénique appropriée, comportant les supports ou vecteurs pharmaceutiques classiques adaptés et des excipients éventuels, telle que par exemple des comprimés ou des gélules, avantageusement à raison d'environ 3 à 500 mg d'alstonine par unité de dosage, l'administration étant faite par voie orale, trois fois par jour, la veille de l'exploration diagnostique in vivo.

L'incubation est avantageusement effectuée sur une durée de 20 à 40 minutes environ, à température ambiante.

Dans les applications in vitro, une fois cette étape d'incubation terminée, on rince l'échantillon à l'alcool, de préférence au méthanol, et on effectue une lecture au microscope à fluorescence.

Pour une utilisation clinique de la méthode et des moyens selon l'invention, notamment dans le diagnostic pré-, per- et/ou post-opératoire et dans le diagnostic de maladies cutanées en confirmation d'autres examens, il convient de pratiquer une révélation de la fluorescence

sous excitation à la lampe de Wood. Cette bioluminescence à la lampe de Wood est utilisée soit par illumination directe, soit par transmission, notamment par des fibres optiques, dans les cas d'explorations endoscopiques.

5 En variante, une composition à l'alstonine selon l'invention peut aussi avantageusement être utilisée en cytogénétique, pour la recherche notamment d'une
10 identification chromosomique aberrante, par la mise en évidence au niveau chromosomique de cassures, de remaniements et/ou de recombinaisons. Dans la pratique
cette identification d'aberration chromosomique, caractéristique d'une maladie génétique héréditaire, s'opère sous la forme d'une bande de luminescence
spécifique d'un ou de plusieurs chromosomes impliqués dans
15 ladite aberration chromosomique et révélée par la technique selon la présente invention.

A titre d'exemple, des études diagnostiques s'appuyant sur une composition d'alstonine conforme à l'invention, selon des protocoles d'applications
20 biologiques appropriés, ont permis de vérifier du point de vue cytogénétique les corrélations entre la perte d'un des deux gonosomes et l'installation de tumeurs solides ou hémopathies malignes:

- dans le cas des sujets féminins, le caryotype
25 devenant alors 45 X 0 par la perte d'un chromosome X,
- dans le cas des sujets masculins, le caryotype devenant alors 45 X 0, par la perte du chromosome Y.

Le mécanisme d'action cytogénétique qui contrôle ces événements peut ainsi être apprécié qualitativement et
30 quantitativement par des études différentielles de coloration et de culture lymphocytaire, permettant de mettre en évidence les ponts et cassures et les recombinaisons.

Bien que la description qui précède et les
35 exemples illustratifs ci-après fassent référence à l'alstonine en tant qu'alcaloïde particulier, l'homme du

métier est à même de concevoir aisément que des résultats comparables peuvent être obtenus si l'on substitue totalement ou partiellement à cet alcaloïde un quelconque équivalent technique de celui-ci pour l'application
5 considérée, notamment son isomère la serpentine.

Exemples d'utilisation pour un diagnostic sur prélèvements biologiques

10 Exemple 1

On a imprégné avec une solution aqueuse d'alstonine contenant environ 200 microgrammes d'alstonine par millilitre divers prélèvements biologiques, qui ont été ensuite incubés pendant 20-40 minutes, puis un examen
15 microscopique sous microscope à lampe de Wood a été effectué.

On a ainsi traité et examiné un étalement de prélèvement de col utérin sur lame de verre et mis en évidence par la bioluminescence observée sous microscope à
20 lampe de Wood la nature cancéreuse des éléments cellulaires.

Exemple 2

On a procédé comme indiqué dans l'exemple 1 sur un
25 étalement de moelle osseuse sur lame de verre.

La bioluminescence observée sous microscope à lampe de Wood a révélé la nature cancéreuse des éléments cellulaires.

30 Exemple 3

En procédant comme indiqué dans l'exemple 1 avec un prélèvement gastrique, après centrifugation et étalement sur lame de verre, on a mis en évidence la présence de cellules tumorales par la bioluminescence de
35 l'étalement sur lame révélée par la méthode sélective selon l'invention.

Exemple 4

En procédant comme indiqué dans l'exemple 1 avec un prélèvement vésical étalé sur lame de verre, on a mis en évidence la présence de cellules tumorales par la bioluminescence de l'étalement sur lame révélée par la méthode sélective selon l'invention.

Les moyens et la méthode selon la présente invention sont également utiles pour la révélation en cytogénétique in vitro des aberrations chromosomiques liées à une maladie génétique héréditaire, cette révélation s'opérant par l'identification d'une bande de luminescence spécifique d'un ou de plusieurs chromosomes impliqués dans des cassures, remaniements ou recombinaisons.

Exemples d'utilisation clinique

Exemple 5

On a administré par voie orale, trois fois à des intervalles sensiblement équivalents sur une journée, la veille de l'exploration diagnostique, une gélule dosée à 250 mg d'alstonine, préparé comme indiqué plus haut, à des patientes chez lesquelles devaient être recherchées et évaluées des tumeurs ovariennes ou vésicales. Une observation par endoscopie effectuée le jour suivant l'administration des gélules, avec transmission à travers l'endoscope des rayonnements d'excitation en UV générés par une lampe de Wood, a permis de vérifier que la détection des tumeurs néoplasiques était aisée par ce moyen. On a également pu établir que le diagnostic différentiel avec des tumeurs cancéreuses était confirmé par prélèvement biopsique et examen anatomopathologique.

Exemple 6

Selon le mode opératoire indiqué dans l'exemple 5, un diagnostic de pancréatite avec évolution en vascularite extra-pancréatique de type Weber-Christian a été effectué
5 chez un malade, Mr. A.G., présentant une évolution torpide depuis 10 ans. On a ainsi pu vérifier significativement que la consolidation était effective après ces dix années.

10 Exemple 7

Selon le mode opératoire indiqué dans l'exemple 5, le diagnostic d'une tumeur de Merkel a été confirmé chez une femme de 74 ans; ce diagnostic a également été confirmé par des analyses histologiques de l'exérèse d'une
15 tumeur du type carcinome neuro-endocrinien de type APUD.

Exemple 8

Selon le mode opératoire indiqué dans l'exemple 5, une ichtyose généralisée a été détectée sous UV chez le
20 jeune S.L., âgé de 8 ans, et il a ainsi été constaté l'existence d'une kératose épaisse sans oligophrénie. En répétant ultérieurement l'investigation selon l'invention, on a vérifié l'amélioration résultant du traitement, se
25 traduisant par un décapage du visage, des membres inférieurs et des membres supérieurs, mais avec persistance de l'ichtyose au niveau du cuir chevelu, de l'abdomen, du thorax et du dos.

30 Exemple 9

Selon le mode opératoire indiqué dans l'exemple 5, une épithéliomatose du visage de type sénile avec évolution vers une formation baso-cellulaire frontale droite a été analysée et localisée chez un patient. En
35 répétant les investigations conformément à l'invention à des intervalles de temps appropriés, on a pu suivre les

effets du traitement appliqué, jusqu'au comblement de la formation baso-cellulaire et à sa cicatrisation.

Exemple 10

5 Le mode opératoire indiqué dans l'exemple 5 a été appliqué à un patient, Mr. C.Y., présentant un lymphome cutané du type maladie de Sésary. Celui-ci a montré sous exploration UV après l'administration d'alstonine dans les conditions indiquées à l'exemple 1 une infiltration
10 lymphoïde du visage de type léonin, ainsi que des zones de dermo-épidermite et des pseudo-plaques de leucodysplasie du visage et des lèvres.

Exemple 11

15 Chez un patient, Mr. D.F., sur lequel il a été opéré comme indiqué dans l'exemple 5, l'effet marqueur de l'alstonine sous UV a montré l'existence d'une récurrence de fibrosarcome, après échec de son traitement thérapeutique à une date antérieure de cinq ans à cette observation sous
20 UV. Le contrôle du traitement par de l'alstonine sous UV a montré la disparition de la luminescence cicatricielle, ce qui témoignait de la récupération du tissu normal au niveau de la tumeur.

25 Exemple 12

 Selon le mode opératoire indiqué dans l'exemple 5, l'existence d'un adéno-carcinome recto-sigmoïdien a été établie et visualisée par la fluorescence de l'alstonine chez un patient, Mr. K., pour lequel ce diagnostic a été
30 confirmé par l'étude anatomopathologique de l'exérèse d'une récurrence d'une lésion villositaire montrant en particulier la présence d'un foyer prolifératif adéno-carcinomateux de stade I.

Exemple 13

En opérant comme indiqué dans l'exemple 5 et après
gastréctomie totale sur un patient, Mr. A.J., en raison de
5 l'existence au niveau de la petite courbure gastrique et
de la chaîne ganglionnaire coéliquale d'une masse
néoplasique, on a pu sous la bioluminescence de la pièce
opératoire faire la topographie des zones
hyperluminescentes, correspondant aux sites des
10 ulcérations néoplasiques de la petite courbure verticale.

Exemple 14

En opérant comme indiqué dans l'exemple 5 sur une
patiente, Mme E.Y., sur laquelle a ensuite été opérée une
15 laparotomie après contrôle échographique, on a pu voir,
grâce à la bioluminescence de l'alstonine après
laparotomie, l'existence d'une luminescence importante sur
un ovaire et vérifier qu'il s'agissait en fait d'une
prolifération métastatique d'une tumeur primaire du sein.

20

Exemple 15

On a opéré comme indiqué dans l'exemple 5 chez un
patient, Mr. G.M., traité par cobaltothérapie de contact
25 pour une tumeur spino-cellulaire de l'aile du nez. La
bioluminescence de l'alstonine a permis de mettre en
évidence la récurrence et des modifications dysplasiques
naso-orbitales du côté opposé (effet ricochet).

30 Des essais comparables menés avec les autres bêta-
carbolines ayant des caractéristiques équivalentes de
fluorescence, à savoir principalement la serpentine, ont
donné des résultats analogues et constituent donc des
équivalents techniques de l'alstonine dans le cadre de la
35 présente invention.

Les moyens selon l'invention sont donc remarquablement utiles pour le cytodiagnostics, qui comprend l'évaluation des affections tumorales et la cytogénétique. In vivo, ils permettent, avec une précision et une facilité jamais atteintes à ce jour, au stade préopératoire de localiser une tumeur avant opération; au stade peropératoire de suivre grâce à la fluorescence l'étude des lésions cancéreuses et des métastases; au stade postopératoire de vérifier par endoscopie, en utilisant des fibres optiques, si des métastases apparaissent ou progressent postérieurement à un traitement anticancéreux ou à une chimiothérapie par des méthodes traditionnelles.

REVENDEICATIONS

1. Composition d'alstonine, pour utilisation comme marqueur sélectif des cellules tumorales et/ou des
5 aberrations chromosomiques, avec révélation de celles-ci par mesure de fluorescence à environ 375 nm.

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comporte de l'alstonine en solution aqueuse à raison d'environ 0,2 à 5 mg/20 ml
10 d'eau, soit à une concentration d'environ 1 à 25% en poids/volume.

3. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle consiste en une solution aqueuse purifiée d'alstonine à saturation, pour dilution
15 extemporanée à des concentrations utiles variant entre environ 5 et 10% en poids/volume.

4. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est sous forme de comprimés ou de gélules, comprenant de préférence environ 3 à 500 mg
20 d'alstonine par unité de dosage, ainsi que des supports ou vecteurs pharmaceutiques classiques et des excipients habituels.

5. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle comporte
25 de la serpentine, en complément ou en remplacement de l'alstonine.

6. Utilisation d'une composition d'alstonine selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 pour l'obtention d'un réactif de cytodiagnostics destiné à la révélation
30 sélective des affections tumorales.

7. Utilisation d'une composition d'alstonine selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 pour la révélation in vitro des aberrations chromosomiques liées à une maladie génétique héréditaire.

35 8. Méthode d'évaluation des tumeurs et/ou de cytogénétique, utile pour le diagnostic des affections

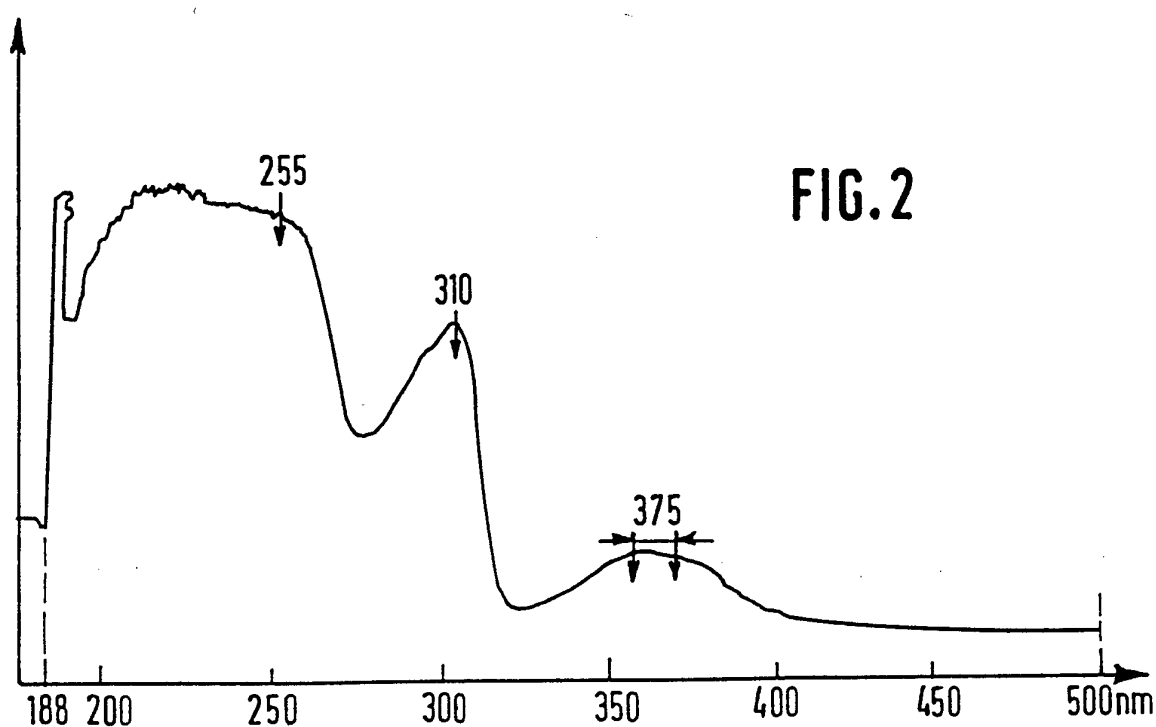
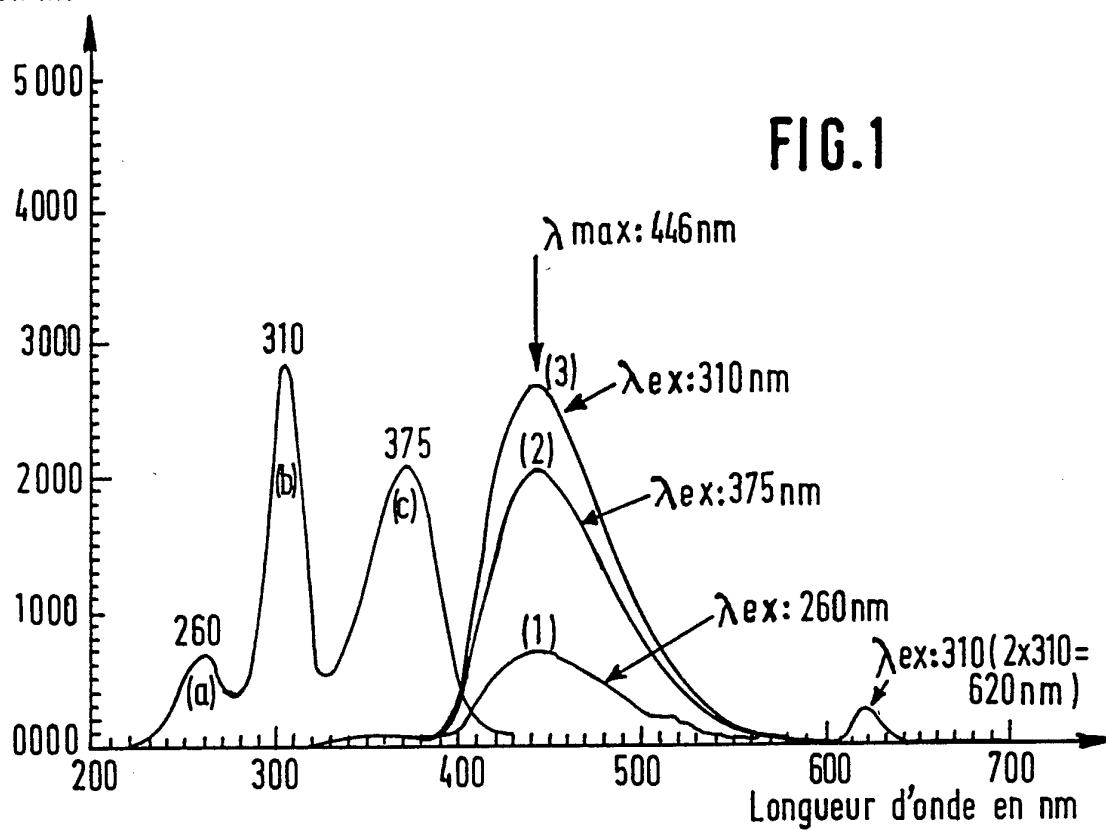
tumorales et des aberrations chromosomiques, caractérisée en ce qu'elle comprend la révélation des cellules tumorales par fluorescence sélective détectée au moyen d'une activation par une lampe de Wood émettant à environ 5 375 nm ou d'une détection au microscope à fluorescence à environ 375 nm, après fixation sélective d'une quantité appropriée d'une composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 2 à 5 et incubation.

9. Méthode selon la revendication 8, caractérisée 10 en ce qu'elle comprend, pour une évaluation in vitro, l'imprégnation de l'échantillon avec une solution aqueuse comportant environ 200 mg d'alstonine par ml et l'incubation pendant 20-40 minutes à température ambiante.

10. Méthode selon la revendication 9, caractérisée 15 en ce qu'on effectue la révélation au moyen d'une lampe de Wood ou d'un microscope à fluorescence.

11. Kit ou trousse pour faciliter le diagnostic des affections tumorales et/ou des aberrations chromosomiques, caractérisé en ce qu'il comporte une 20 composition comprenant de l'alstonine selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

1/4

Signal du spectrofluorimètre
en millivolts

2/4

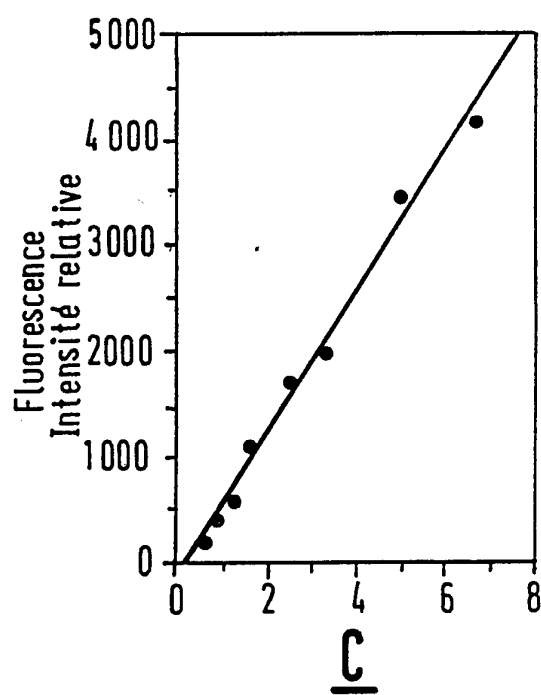
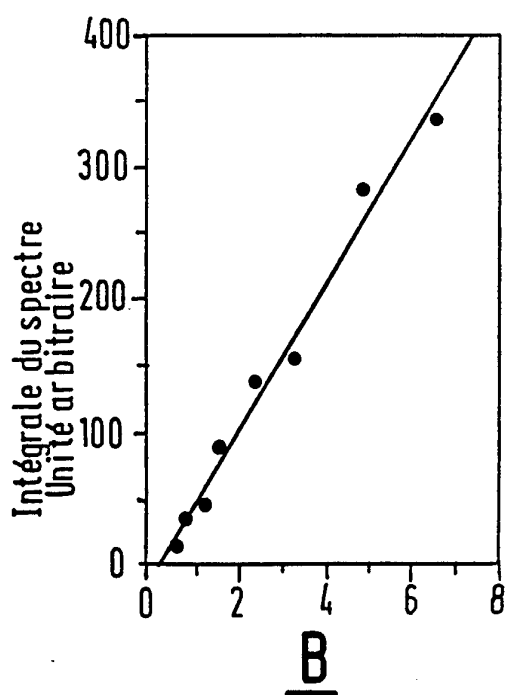
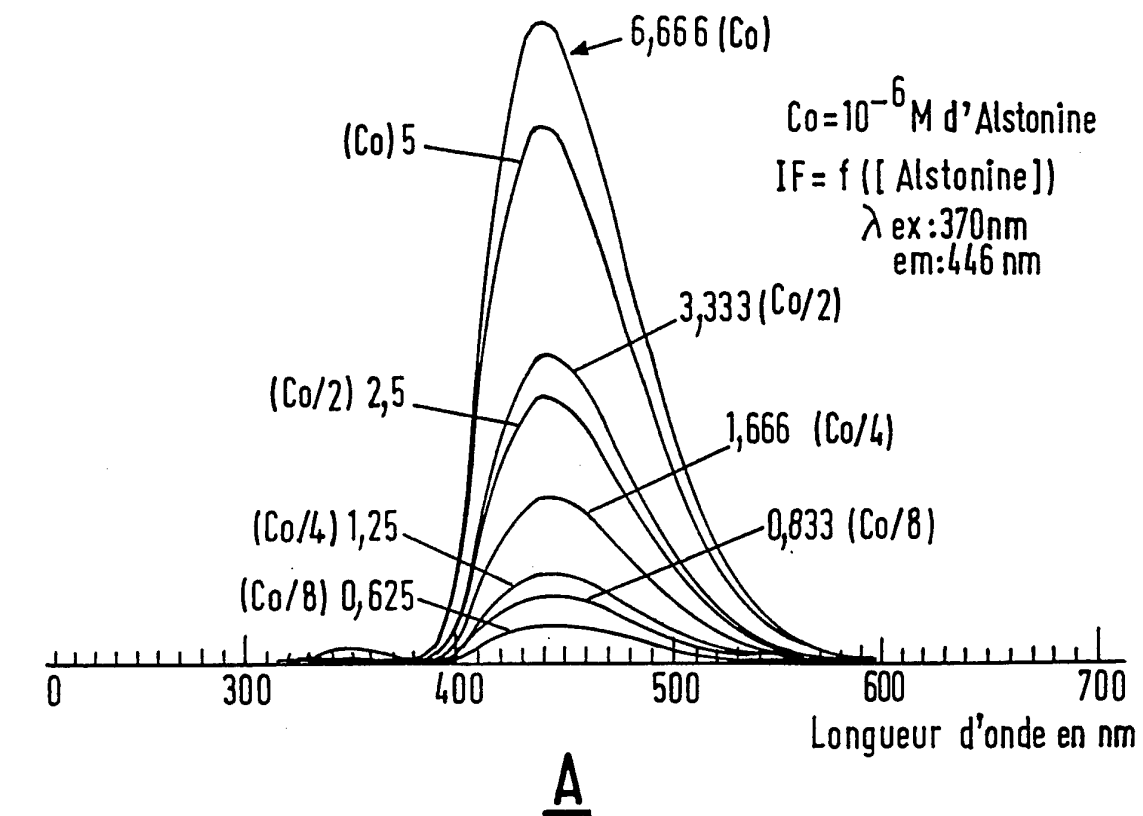


FIG. 3

3/4

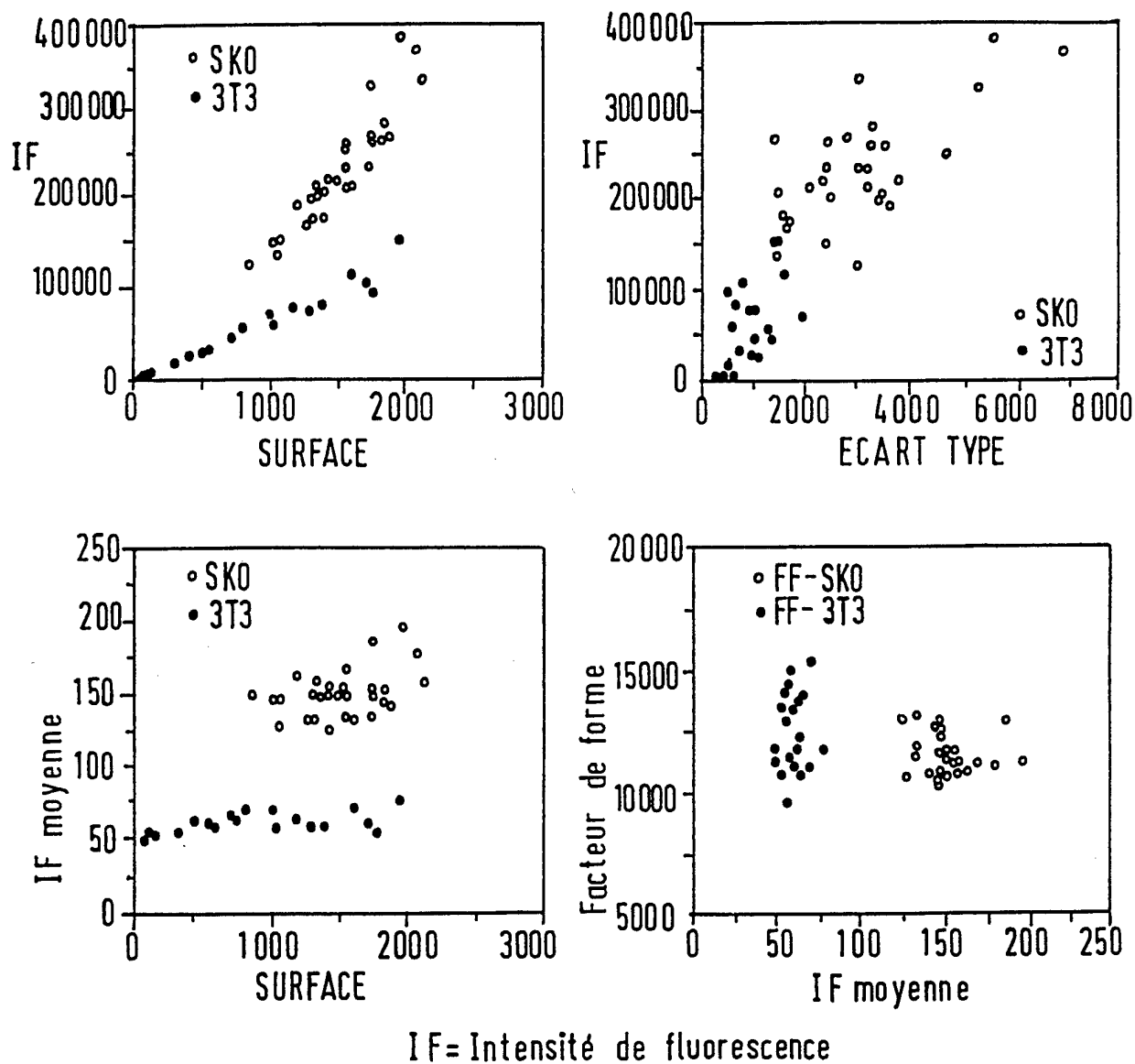
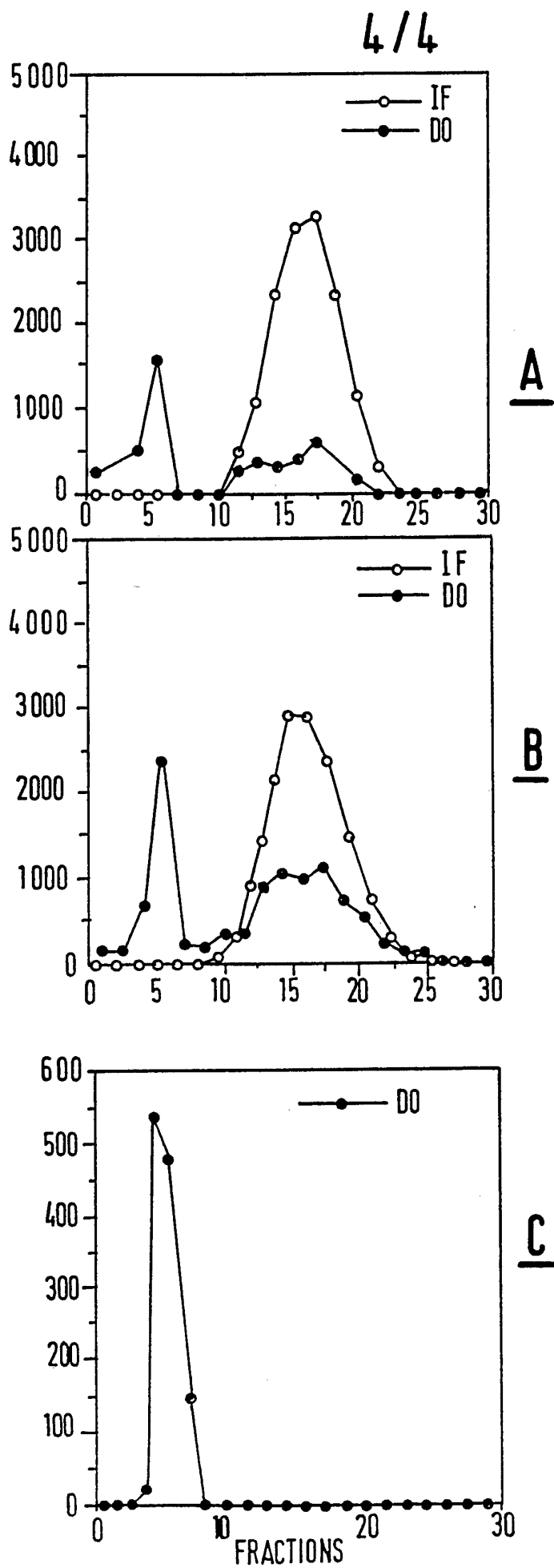


FIG. 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR 93/00762

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. 5 : G01N1/30; A61K31/475; G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. 5 : G01N ; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR,A,2 439 783 (M. BELJANSKI ET AL.) 23 May 1980 cited in the application ---	
A	EP,A,0 059 817 (M.BELJANSKI ET AL.) 15 September 1982 cited in the application ---	
A	FR,A,2 419 725 (M. BELJANSKI ET AL.) 12 October 1979 ---	
A	IRCS MEDICAL SCIENCE Vol. 12, 1984, pages 587 - 588 M. BELJANSKI ET AL. 'THREE ALKALOIDS AS SELECTIVE DESTROYERS OF THE PROLIFERATIVE CAPACITY OF CANCER CELLS.' ---	
	..-/--	



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 September 1993 (22.09.93)

Date of mailing of the international search report

6 October 1993 (06.10.93)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00762

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ONCOLOGY Vol. 43, 1986, pages 198 - 203 M. BELJANSKI ET AL. 'THREE ALKALOIDS AS SELECTIVE DESTROYERS OF CANCER CELLS IN MICE.' cited in the application -----	

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9300762
SA 77186

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 22/09/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2439783	23-05-80	FR-A- 2419725 FR-A,B 2450607	12-10-79 03-10-80
EP-A-0059817	15-09-82	None	
FR-A-2419725	12-10-79	FR-A,B 2439783 FR-A,B 2450607	23-05-80 03-10-80

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

PCT/FR 93/00762

Demande Internationale No

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB CIB 5 G01N1/30; A61K31/475; G01N33/50		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	G01N ; A61K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie °	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
A	FR,A,2 439 783 (M. BELJANSKI ET AL.) 23 Mai 1980 cité dans la demande ---	
A	EP,A,0 059 817 (M.BELJANSKI ET AL.) 15 Septembre 1982 cité dans la demande ---	
A	FR,A,2 419 725 (M. BELJANSKI ET AL.) 12 Octobre 1979 ---	
A	IRCS MEDICAL SCIENCE vol. 12, 1984, pages 587 - 588 M. BELJANSKI ET AL. 'THREE ALKALOIDS AS SELECTIVE DESTROYERS OF THE PROLIFERATIVE CAPACITY OF CANCER CELLS.' --- -/-	
° Catégories spéciales de documents cités:¹¹ "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international 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 international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à 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 "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. "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
22 SEPTEMBRE 1993	0 6. 10. 93	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	CARTAGENA ABELLA P	

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUEES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie ^o	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
A	ONCOLOGY vol. 43, 1986, pages 198 - 203 M. BELJANSKI ET AL. 'THREE ALKALOIDS AS SELECTIVE DESTROYERS OF CANCER CELLS IN MICE.' cité dans la demande -----	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9300762
SA 77186

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

22/09/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A-2439783	23-05-80	FR-A- 2419725 FR-A, B 2450607	12-10-79 03-10-80
EP-A-0059817	15-09-82	Aucun	
FR-A-2419725	12-10-79	FR-A, B 2439783 FR-A, B 2450607	23-05-80 03-10-80