



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 1992/02/24
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 1992/09/03
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2003/09/16
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 1992/10/23
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: EP 1992/000408
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 1992/014467
(30) Priorités/Priorities: 1991/02/25 (576/91-1) CH;
1991/12/02 (3522/91-4) CH

(51) Cl.Int.⁵/Int.Cl.⁵ A61K 31/49, A61K 31/57, A61K 31/55,
A61K 9/127, A61K 9/14, A61K 31/545, A61K 31/54,
A61K 9/50, A61K 31/495, A61K 38/13

(72) Inventeurs/Inventors:
CHAUFFERT, BRUNO, FR;
GENNE, PHILIPPE, FR;
GUTIERREZ, GILLES, FR;
MAUVERNAY, ROLLAND-YVES, CH

(73) Propriétaires/Owners:
DEBIOPHARM S.A., CH;
PATRINOVE, FR;
INSERM, FR

(74) Agent: GOWLING LAFLEUR HENDERSON LLP

(54) Titre : AGENTS THERAPEUTIQUES POUR LE TRAITEMENT DE LA RESISTANCE MULTI-DROGUE DANS LES
CAS DE CANCER

(54) Title: THERAPEUTIC AGENTS FOR THE TREATMENT OF MULTIDRUG RESISTANCE TO CANCERS

(57) **Abrégé/Abstract:**

On utilise de la cinchonine, dihydrocinchonine ou hydroquinidine à titre de substance inhibitrice de la résistance multidrogue dans le traitement de tumeurs cancéreuses au moyen d'agents cytotoxiques. En particulier on utilise la cinchonine, la dihydrocinchonine ou l'hydroquinidine dans la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de tumeurs cancéreuses développant le phénomène de résistance multidrogue. Application au traitement des cancers chez l'homme.





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

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : A61K 31/49 2081313		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 92/14467 (43) Date de publication internationale: 3 septembre 1992 (03.09.92)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/EP92/00408 (22) Date de dépôt international: 24 février 1992 (24.02.92) (30) Données relatives à la priorité: 576/91-1 25 février 1991 (25.02.91) CH 3522/91-4 2 décembre 1991 (02.12.91) CH (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): DEBIO-PHARM S.A. [CH/CH]; 15-17, rue des Terraux, CH-1003 Lausanne (CH). PATRINOVE [FR/FR]; 39, rue du Lt.-Colonel-Prévost, F-69006 Lyon (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CHAUFFERT, Bruno [FR/FR]; 57, rue d'Auxonne, F-21000 Dijon (FR). GENNE, Philippe [FR/FR]; 6, Grand Rue, F-21121 Ahuy (FR). GUTIERREZ, Gilles [FR/FR]; 39, rue Lt.-Colonel-Prévost, F-69006 Lyon (FR). MAUVER-NAY, Rolland-Yves [FR/CH]; 15-17, rue des Terreaux, CH-1003 Lausanne (CH).			(74) Mandataire: VUILLE, Roman: Debiopharm S.A., Case Postale 82, CH-1000 Lausanne 9 (CH). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), AU, BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), MC (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: THERAPEUTIC AGENTS FOR THE TREATMENT OF MULTIDRUG RESISTANCE TO CANCERS (54) Titre: AGENTS THERAPEUTIQUES POUR LE TRAITEMENT DE LA RESISTANCE MULTIDROGUE DE CANCERS (57) Abstract Cinchonine, dihydrocinchonine or hydroquinidine are used as multidrug resistance inhibiting substance in the treatment of cancerous tumors by the use of cytotoxic agents. Particularly, cinchonine, dihydrocinchonine or hydroquinidine are used in the preparation of pharmaceutical compositions used in the treatment of cancerous tumors developping the phenomenon of multi-drug resistance. Application to the treatment of human cancers. X On utilise de la cinchonine, dihydrocinchonine ou hydroquinidine à titre de substance inhibitrice de la résistance multidrogue dans le traitement de tumeurs cancéreuses au moyen d'agents cytotoxiques. En particulier on utilise la cinchonine, la dihydrocinchonine ou l'hydroquinidine dans la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de tumeurs cancéreuses développant le phénomène de résistance multidrogue. Application au traitement des cancers chez l'homme.			

AGENTS THERAPEUTIQUES POUR LE TRAITEMENT DE LA RESISTANCE MULTIDROGUE
DE CANCERS

L'invention a pour objet un agent thérapeutique nouveau utilisé dans le traitement thérapeutique de tumeurs cancéreuses, plus précisément un agent destiné à renforcer l'efficacité de substances cytotoxiques utilisées dans le traitement de tumeurs cancéreuses humaines ou animales développant le phénomène de résistance multiple aux agents anti-cancéreux (résistance multidrogue - "multiple drug resistance : MDR").

Le phénomène de la résistance multidrogue est connu et ne se limite pas seulement aux agents anti-cancéreux. A ce jour, diverses explications sont avancées quant à la compréhension des mécanismes mis en jeu. Pour ce qui est du comportement des cellules tumorales cancéreuses, on a pu mettre en évidence plusieurs systèmes de résistance distincts : s'agissant par exemple de la perméabilité de la membrane cellulaire, l'intervention d'une glyco-protéine spécifique (P-gp) est reconnue, mais il est admis que d'autres facteurs protéiques peuvent intervenir.

L'approche de ce phénomène est donc multiple, sinon complexe, ce qui rend d'autant plus difficile la recherche de solutions appropriées.

L'application de substances ou drogues cytotoxiques dans le traitement des tumeurs cancéreuses se heurte à plusieurs obstacles. La plupart des drogues utilisées à cet effet présentent premièrement une toxicité intrinsèque, non distinctive, source d'effets secondaires néfastes; d'autre part, au vu de cette toxicité intrinsèque, leur administration au patient s'en trouve quantitativement limitée et, dans de nombreux cas, l'activité souhaitée au niveau des tumeurs n'est plus suffisante.

2081343

Divers moyens ont été déjà proposés en vue de surmonter de tels obstacles, comme la vectorisation de la substance cytotoxique, par exemple sous forme de son incorporation dans un liposome. Dans un tel cas cependant, si la toxicité intrinsèque de la substance cytotoxique est temporairement occultée et donc avec des effets secondaires limités pour le patient, son activité sur le site tumoral n'est pas forcément rétablie au niveau d'efficacité souhaité.

En outre, pour peu que les cellules tumorales soumises à ce traitement développent le phénomène de résistance multidrogue, innée ou acquise, la substance cytotoxique perd quasiment toute efficacité.

On connaît à ce jour plusieurs substances montrant in vitro une activité inhibitrice de la MDR : ce sont pour l'essentiel des substances non cytotoxiques, généralement de caractère hydrophobe, tels des alcaloïdes par exemple. In vitro, leur utilisation conjointe à une drogue cytotoxique apparaît comme satisfaisante, le phénomène dit MDR étant significativement inhibé au niveau cellulaire pour que la dite drogue joue pleinement son rôle.

Il en est tout autrement, cependant, lorsque l'on tente une transposition de telles observations sur un organisme vivant. Les substances inhibitrices de la MDR, alcaloïdes ou autres, présentent également une toxicité intrinsèque qui limite leur administration en-deçà d'un seuil (taux sérique) où l'activité recherchée (inhibition de la MDR) est également perdue. En outre, bien que la substance cytotoxique soit administrée sous forme libre, ou sous forme de liposome par exemple, on a observé comme facteur limitatif important une augmentation concomittante de la toxicité intrinsèque de la drogue cytotoxique due à un changement significatif de sa distribution pharmacologique dans l'organisme. De fait, face à de tels inconvénients,

l'homme du métier se trouve particulièrement démunie, s'agissant du traitement in vivo de tumeurs cancéreuses développant le phénomène de résistance multidroque (MDR). La quinine, récemment proposée à titre de substance inhibitrice de la MDR, illustre exactement ce cas de figure et son utilisation à des fins thérapeutiques humaines s'en trouve limitée d'autant.

L'invention a le mérite d'apporter une solution originale et particulièrement efficace au problème évoqué plus haut, ceci d'autant plus qu'elle vise l'utilisation de substances de structure voisine de celle de la quinine. De manière surprenante cependant, de telles substances se sont révélées, à dose comparable, plus efficaces et en même temps nettement moins toxiques que la quinine dans le contexte présent. Comme on l'a vu ci-dessus, cette voie semblait cependant compromise, sinon exclue, quant à l'utilisation de tels alcaloïdes à titre de substances inhibitrices de la résistance multiple aux agents anti-cancéreux, sur le plan thérapeutique.

L'invention a pour objet l'utilisation de cinchonine, de dihydrocinchonine ou d'hydroquinidine à titre de substance inhibitrice de la résistance multidroque (MDR) dans le traitement de tumeurs cancéreuses au moyen d'agents cytotoxiques.

L'invention a également pour objet une composition pharmaceutique utilisée dans le traitement de tumeurs cancéreuses développant le phénomène de résistance multidroque, contenant de la cinchonine, de la dihydrocinchonine ou de l'hydroquinidine à titre de substance inhibitrice de la MDR.

La cinchonine et la dihydrocinchonine sont des substances connues, de la classe des alcaloïdes, proposées comme agents thérapeutiques anti-malaria. L'hydroquinidine, pour sa

part, a été proposée comme agent antiarythmisant. La pharmacologie de telles substances est connue; il en va de même pour leur toxicité.

Selon l'invention, cinchonine, dihydrocinchonine et hydroquinidine peuvent être avantageusement utilisées sous forme de composition pharmaceutique, solubilisées dans un milieu approprié à une administration parentérale, par exemple la voie sous-cutanée ou intra-musculaire, ou encore sous forme de suspension ou comprimé destiné à l'administration par voie orale. Au sein de telles compositions, cinchonine, dihydrocinchonine ou hydroquinidine peuvent être également associées à un véhicule particulière telle une microcapsule ou microparticule, une nanocapsule ou nanoparticule. A titre de véhicule particulière, on peut avantageusement utiliser un liposome.

Au sein des compositions pharmaceutiques selon l'invention, on peut utiliser à titre d'agent inhibiteur de la MDR l'une des substances sus-mentionnées à titre d'ingrédient unique, la cinchonine par exemple; on peut également utiliser un mélange de telles substances, par exemple cinchonine et dihydrocinchonine, dans un rapport pondéral variable.

L'invention aura par conséquent pour objet une composition pharmaceutique destinée au traitement des tumeurs cancéreuses, contenant à titre d'agent inhibiteur de la MDR une ou plusieurs substances choisies parmi cinchonine, dihydrocinchonine et hydroquinidine.

Il est en outre entendu, que de telles substances peuvent se présenter sous forme de stéréoisomères purs ou de mélanges de tels stéréoisomères, respectivement d'énantiomères purs ou de mélange d'énantiomères. S'agissant par exemple de cinchonine ou de dihydrocinchonine, on peut en effet

distinguer divers stéréoisomères, selon la configuration en C8 ou en C9.

Selon l'invention également, des substances telles que cinchonine, dihydrocinchonine ou hydroquinidine peuvent être utilisées conjointement à d'autres substances inhibitrices de la MDR, plus particulièrement des substances dont l'activité inhibitrice a déjà été confirmée. A ce titre, on peut citer de manière non exhaustive, une ou plusieurs substances connues choisies parmi l'amiodarone, la quinine, la quinidine, la cinchonidine, le vérapamil, la cyclosporine A, les céphalosporines, le bipéridène, la lidocaïne, la chlorpromazine, la pentazocine, la prométhazine, le potassium canmrénoate, l'amitriptyline, le propranolol, le déméthoxyvérapamil, le diltiazème, la thioridazine, la trifluopérazine, la chloroquine, la sdb-éthylène diamine, la réserpine, le tamoxifène, le torémifène, l'hydrocortisone, la progestérone, le salbutamol et leurs dérivés acylés ou esters.

Selon l'invention, l'effet inhibiteur souhaité peut être obtenu à des doses auxquelles on n'observe pas chez les sujets traités les effets secondaires néfastes dus à la toxicité intrinsèque de la cinchonine, de la dihydrocinchonine ou de l'hydroquinidine. Bien entendu, les doses thérapeutiques optimales dépendront du type de tumeur traité, de la nature de l'agent cytotoxique utilisé conjointement, du sujet traité ou encore d'autres facteurs que l'homme du métier sera en mesure d'appréhender.

Des substances cytotoxiques sensibles au phénomène de la MDR, dont l'effet peut être avantageusement augmenté par l'action concomitante de cinchonine, dihydrocinchonine ou hydroquinidine, sont mentionnées ci-après; cette énumération n'est pas exhaustive pour autant.

Ce sont pour l'essentiel des substances hydrophobes, ayant en commun un résidu azoté chargé positivement, tels les alcaloïdes de la vinca, les anthracyclines ou produits analogues, les épipodophyllotoxines ou les antibiotiques antitumoraux par exemple. On peut citer en particulier la vincristine, la vinblastine, la vindésine, la vinorelbine, la doxorubicine, la déoxydoxorubicine, la tétrahydropyranyl-adriamycine, l'épidoxorubicine, l'aclacinomycine, la déméthoxydaunorubicine, la daunorubicine, le m-amsa, la mitoxantrone, le bisanthrène, le déméthoxydaunorubisanthrène, la mithramycine, l'actinomycine D, la puromycine, l'étoposide, le ténoposide, l'émétine, l'éthidium bromide, la cytochalasine, la colchicine et le taxol®.

Grâce à l'invention, on est en mesure de proposer un traitement thérapeutique approprié concernant de nombreuses tumeurs cancéreuses présentant à des degrés divers une résistance multiple aux agents anti-cancéreux (MDR). A ce propos, on peut citer entre autres la leucémie aigue myeloblastique, la leucémie aigue lymphoblastique, le neuroblastome, le cancer du poumon à petites cellules, le cancer de l'ovaire, le lymphome malin non hodgkinien et le plasmocytome diffus. Ce sont des cancers qui peuvent présenter une MDR induite, en réponse au traitement avec un agent cytotoxique.

On peut également traiter des cancers présentant une MDR innée ou, pour le moins, des cellules cancéreuses caractérisées par la présence, avant tout traitement, du gène correspondant de la P-gp (mdr 1) à un taux relativement élevé. Ce sont, par exemple, l'adénocarcinome du colon, l'adénocarcinome du rein, le carcinome corticosurrénalien, le phéochromocytome, les sarcomes de l'enfant et la leucémie secondaire. Cette liste n'est cependant pas exhaustive. Les expérimentations décrites ci-après illustreront la présente invention de manière plus détaillée, sans pour autant la limiter.

a) Mise en évidence in vitro de l'activité
inhibitrice de la cinchonine

a.1. Des portions de 10'000 cellules provenant de la lignée DHD/K12/TRb ("drug resistant cell line"/MDR+) ont été réparties en séries et implantées sur lamelle, 48 heures avant traitement.

On a procédé à une première incubation de 60 minutes en milieu HAMF 10, répartissant les additifs comme suit .

témoins	:	----
série zéro	:	doxorubicine (DXR) à 10 µg/ml
série 1	:	DXR (10 µg/ml) + cinchonine (5 µg/ml)
série 2	:	DXR (10 µg/ml) + quinine (5 µg/ml)
série 3	:	DXR (10 µg/ml) + vérapamil (5 µg/ml)

Les séries 2 et 3 sont utilisées à titre comparatif, s'agissant de substances inhibitrices de la MDR connues. On a procédé ensuite à une seconde incubation, de 75 minutes, en milieu HAMF 10 additionné d'une nouvelle quantité de substance inhibitrice (séries 1 à 3). L'appréciation semi quantitative de la présence de DXR dans le cytoplasme des cellules traitées a été effectuée en microscopie de fluorescence (lecture double aveugle) pour donner les résultats ci-après.

Témoins	:	0	série zéro	:	0
série 1	:	+++	série 2	:	+++
série 3	:	+++			

0 = absence de fluorescence

+ = unité arbitraire de fluorescence

On constate ainsi que la cinchonine exerce un effet inhibiteur de la MDR. Cet effet est comparable à celui constaté pour la quinine et le vérapamil.

a.2. On a procédé à une expérimentation comparable, à l'aide de portions de 10'000 cellules DHD/K12/TRb chacune, implantées 24 heures avant traitement.

Traitement proprement dit : incubation de 72 heures en milieu HAMF 10 + 10% SVF, en présence ou non de cinchonine. Pour ce qui est de l'agent cytotoxique, on a utilisé l'étoposide (VP 16), la vincristine, la vindésine, la mitoxantrone (MXN), respectivement la doxorubicine, à un taux constant. La concentration de cinchonine a par contre varié comme suit :

0 - 0,1 - 1 - 5 - 10 μ mole

Les taux de survie des cellules implantées ont été appréciés par le moyen du test au bleu et convertis en % d'activité de la drogue antimitotique. Les résultats observés sont rassemblés dans Fig. 1. Ils confirment que la cinchonine exerce une activité inhibitrice de la MDR importante et potentialise l'activité cytotoxique de l'agent antimitotique utilisé.

a.3. On a procédé à une expérimentation analogue à la précédente, mais en vérifiant l'activité inhibitrice de la cinchonine sur d'autres lignées cellulaires tumorales coliques dont le produit de l'expression du gène mdr-1 et l'expression de la P-gp 180 ont été clairement établies.

Les cellules retenues ont été implantées 24 heures avant traitement, à raison de 10'000 cellules par puits. Le traitement proprement dit consiste en une incubation de 72 heures, en présence d'une dose de doxorubicine (DXR) de concentration constante, et d'une dose croissante de cinchonine, respectivement vérapamil :

0 - 1 - 5 - 10 - 20 - 40 μ mole

Les taux de survie cellulaire ont été déterminés au moyen du test au bleu et les résultats correspondants rassemblés dans la Fig. 2. Les lignées cellulaires utilisées furent les suivantes :

CACO2 - HCT15 - SW480 - PROb (DHD/K12/TRb)

Les résultats reportés dans Fig. 2 sont la moyenne de trois mesures. Ils confirment clairement l'activité inhibitrice de la cinchonine.

**b) Mise en évidence in vitro de l'activité
inhibitrice de l'hydroquinidine**

Des portions de 100'000 cellules provenant de la lignée DHD/K12/TRb ("drug resistant cell line"/MDR+) ont été réparties en séries et implantées sur lamelle, 24 heures avant traitement comme indiqué ci-après, l'agent cytotoxique étant de la doxorubicine (DXR) contenant 3% de DXR 14C.

témoins	:	----
série zéro	:	doxorubicine (DXR) à 10 µg/ml
série 1	:	DXR (10 µg/ml) + hydroquinidine (15 µg/ml)
série 2	:	DXR (10 µg/ml) + quinine (15 µg/ml)
série 3	:	DXR (10 µg/ml) + vérapamil (15 µg/ml)

Les séries 2 et 3 sont utilisées à titre comparatif, s'agissant de substances inhibitrices de la MDR connues. Après une incubation de deux heures, suivie de trois lavages successifs au moyen de PBS-BSA, trypsinisation et comptage de cellules, on a procédé à la mesure de la radioactivité intracellulaire à l'aide d'un compteur bêta.

De ces mesures, on en a déduit un taux de doxorubicine intracytoplasmique directement lié à l'effet inhibiteur de la substance testée. Ces résultats sont rassemblés ci-après:

2031313

Série no.	Agent	Radioactivité
0	DXR seule	200 cpm
1	DXR + hydroquinidine	875 cpm
2	DXR + quinine	850 cpm
3	DXR + vérapamil	1050 cpm

On constate ainsi que l'hydroquinidine exerce un effet inhibiteur significatif de la MDR. Cet effet est pour le moins comparable à celui constaté pour la quinine.

**c) Mise en évidence ex vivo de l'activité
inhibitrice de la cinchonine**

c.1. A divers groupes de 3 rats chacun, on a injecté par voie intra-veineuse l'une des deux substances inhibitrices ci-après, aux doses non toxiques maximales :

cinchonine : 50 mg /kg (1)

quinine : 40 mg /kg (2)

Une heure après l'injection i.v., on a prélevé des échantillons sanguins de chaque sujet, par ponction cardiaque. On a procédé de même concernant des rats témoins, non traités préalablement.

c.2. Des portions de 10'000 cellules DHD/K12/TRb (voir a.1) ont été implantées 48 heures avant le traitement proprement dit comme indiqué ci-après, l'agent cytotoxique étant la doxorubicine (DXR).

2081343

témoins : ----
série zéro : DXR (10 µg/ml) + sérum rats témoins
série 1 : DXR (10 µg/ml) + sérum rats (1)
série 2 : DXR (10 µg/ml) + sérum rats (2)

Après une première incubation d'une heure, on a procédé à 3 lavages successifs au moyen de HAMF 10, puis effectué une seconde incubation des cellules lavées durant une heure, en présence uniquement d'une nouvelle dose de sérum correspondant. L'appréciation semi quantitative de la rétention de DXR par les cellules traitées a été effectuée en microscopie de fluorescence (lecture double aveugle) pour donner les résultats ci-après.

témoins	:	0	série zéro	:	0
série 1	:	+++	série 2	:	++

0 = absence de fluorescence

+ = unité arbitraire de fluorescence

On constate ainsi que la cinchonine est efficace ex vivo concernant l'effet inhibiteur de la MDR, pour le moins comparable à celui de la quinine.

**d) Mise en évidence ex vivo de l'activité
inhibitrice de l'hydroquinidine**

d.1. A divers groupes de 3 rats chacun on a injecté par voie intra-péritonéale l'une des deux substances inhibitrices ci-après, aux doses suivantes :

Hydroquinidine	:	75 mg /kg	(1)
Quinine	:	75 mg /kg	(2)

Une heure après l'injection i.p., on a prélevé des échantillons sanguins de chaque sujet, par ponction

cardiaque. On a procédé de même concernant des rats témoins, non traités préalablement.

d.2. Des portions de 100'000 cellules DHD/K12/TRb (voir a.1.) ont été implantées 24 heures avant le traitement proprement dit, comme indiqué ci-après, l'agent cytotoxique étant de la doxorubicine (DXR) contenant 3% de DXR 14C.

témoins : ----
série zéro : DXR (15 µg/ml) + sérum rats témoins
série 1 : DXR (15 µg/ml) + sérum rats (1)
série 2 : DXR (15 µg/ml) + sérum rats (2)

Après une incubation de deux heures, suivie de trois lavages successifs au moyen de PBS-BSA, trypsinisation et comptage de cellules, on a procédé à la mesure de la radioactivité intracellulaire à l'aide d'un compteur bêta.

De ces mesures, on en a déduit un taux de doxorubicine intracytoplasmique directement lié à l'effet inhibiteur de la substance testée. Ces résultats sont rassemblés ci-après:

Série no.	Agent	Radioactivité
0	DXR seule	250 cpm
1	DXR + hydroquinidine	750 cpm
2	DXR + quinine	500 cpm

On constate ainsi, pour une même concentration sérique de substance inhibitrice, que le taux de DXR intracytoplasmique de la série 1 (DXR + hydroquinidine) est de trois fois

supérieur à celui de la série zéro (DXR seule); de même, ce taux est environ une fois et demie supérieur à celui de la série 2 (DXR + quinine).

**e) Comparaison du pouvoir inhibiteur de la
cinchonine par rapport à celui de la quinine par
expérimentation ex vivo**

e.1. A divers groupes de 3 rats chacun on a injecté par voie intra-péritonéale l'une des trois substances inhibitrices ci-après, aux doses suivantes :

cinchonine	:	75 mg /kg	(1)
cinchonine	:	100 mg /kg	(2)
quinine	:	75 mg /kg	(3)
quinine	:	100 mg /kg	(4) *

* 2 rats morts sur 3

Une heure après l'injection i.p., on a prélevé des échantillons sanguins de chaque sujet, par ponction cardiaque. On a procédé de même concernant des rats témoins, non traités préalablement.

e.2. Des portions de 100'000 cellules DHD/K12/TRb (voir a.1.) ont été implantées 24 heures avant le traitement proprement dit en présence de l'agent cytotoxique (doxorubicine (DXR) contenant 3% de DXR 14C).

témoins	:	----	
série zéro	.	DXR (5 µg/ml) + sérum rats témoins	
série 1	:	DXR (5 µg/ml) + sérum rats	(1)
série 2	:	DXR (5 µg/ml) + sérum rats	(2)
série 3	:	DXR (5 µg/ml) + sérum rats	(3)
série 4	:	DXR (5 µg/ml) + sérum rats	(4)

2081343
Après une incubation de deux heures, suivie de trois lavages successifs au moyen de PBS-BSA, trypsinisation et comptage de cellules, on a procédé à la mesure de la radioactivité intracellulaire à l'aide d'un compteur bêta.

De ces mesures, on en a déduit un taux de doxorubicine intracytoplasmique directement lié à l'effet inhibiteur de la substance testée. Ces résultats sont rassemblés dans Fig. 3.

On constate ainsi, pour une même concentration sérique de substance inhibitrice, que le taux de DXR intracytoplasmique de la série 1 (DXR + cinchonine) est de six fois supérieur à celui de la série zéro (DXR seule); de même, ce taux est environ deux fois supérieur à celui de la série 3 (DXR + quinine), même après dilution des sérums d'un facteur 2, respectivement 4.

On observe en outre que la cinchonine est nettement moins toxique que la quinine : pour une injection i.p. de 100 mg/kg, deux sujets sur trois traités au moyen de quinine sont décédés après injection.

e.3. On a procédé à une expérimentation similaire, mettant en oeuvre une lignée cellulaire différente : K 562/ADM (myelogenous leukemia cell line).

Il se confirme également, dans ce cas-ci, que la cichonine témoigne d'une activité inhibitrice supérieure à celle de la quinine.

f) Comparaison du pouvoir inhibiteur de la cinchonine par rapport à celui de la quinine par expérimentation in vivo.

On a procédé à J0 à une injection intrapéritonéale de 1'000'000 de cellules DHD/K12/TRb par rat, afin d'induire

chez les sujets la carcinomatose péritonéale d'origine colique utilisée comme modèle expérimental.

A J1, on a procédé à l'injection simultanée, par voie intrapéritonéale, de doxorubicine (DXR) libre et de substance inhibitrice, en solution dans du glucose aqueux à 5% et aux doses indiquées.

- Groupe 1 : DXR/quinine à la dose de 0,5 mg/kg DXR respectivement 80 mg/kg quinine.
- Groupe 2 : DXR/cinchonine à la dose de 0,5 mg/kg DXR, respectivement 80 mg/kg cinchonine
- Groupe 3 : DXR (0,5 mg/kg)
- Groupe 4 : témoins

Les groupes étaient constitués de 5 rats chacun. Ceux-ci ont été sacrifiés à J27 et, après autopsie, on a procédé à la mesure du poids des nodules tumoraux de chaque sujet. Les valeurs répertoriées ci-dessous sont des moyennes obtenues sur 5 sujet par groupe.

- Groupe 1 : 0,2 g ($\pm 0,2$)
- Groupe 2 : 0,1 g ($\pm 0,1$)
- Groupe 3 : 4,8 g ($\pm 1,2$)
- Groupe 4 : 5,0 g ($\pm 1,2$)

On constate ainsi que quinine et cinchonine inhibent significativement la résistance des tumeurs traitées au moyen de doxorubicine. Pour un dosage identique, la cinchonine se montre plus puissante que la quinine dans ce type d'expérimentation; l'avantage complémentaire réside

2081313

dans la plus faible toxicité de la cinchonine comme démontré précédemment.

REVENDICATIONS

1. Utilisation de cinchonine, dihydrocinchonine ou hydroquinidine à titre de substance inhibitrice de la résistance multidroge dans le traitement de tumeurs cancéreuses au moyen d'agents cytotoxiques.
2. Utilisation de cinchonine, dihydrocinchonine ou hydroquinidine pour renforcer l'activité de substances cytotoxiques dans le traitement de tumeurs cancéreuses développant le phénomène de résistance multidroge.
3. Utilisation de cinchonine, dihydrocinchonine ou hydroquinidine dans la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de tumeurs cancéreuses développant le phénomène de résistance multidroge.
4. Composition pharmaceutique utilisée dans le traitement de tumeurs cancéreuses développant le phénomène de résistance multidroge, caractérisée en ce qu'elle contient de la cinchonine, dihydrocinchonine ou hydroquinidine ou une combinaison de celles-ci à titre d'agent inhibiteur de la résistance multidroge et un véhicule.
5. Composition pharmaceutique selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle contient à titre d'agent inhibiteur de la résistance multidroge de la cinchonine et de la dihydrocinchonine.
6. Composition selon l'une des revendications 4 et 5, caractérisée en ce que la cinchonine, dihydrocinchonine ou hydroquinidine se présente sous une forme stéréoisomérique, ou énantiomérique, pure ou sous forme de mélanges de stéréoisomères, ou d'énantiomères.

7. Composition selon l'une des revendications 4 à 6, caractérisée en ce qu'elle contient à titre d'agent inhibiteur de la résistance multidroque de la cinchonine, dihydrocinchonine ou hydroquinidine et en outre au moins l'une des substances choisies parmi l'amiodarone, la quinine, la quinidine, la cinchonidine, le vérapamil, la cyclosporine A, les céphalosporines, le bipéridène, la lidocaïne, la chlorpromazine, la pentazocine, la prométhazine, le potassium canrénoate, l'amitriptyline, le propranolol, le déméthoxyvérapamil, le diltiazème, la thioridazine, la trifluopéryzine, la chloroquine, la sbd-éthylène diamine, la réserpine, le tamoxifène, le torémifène, l'hydrocortisone, la progestérone, le salbutamol et leurs dérivés acylés ou esters.

8. Composition selon l'une des revendications 4 à 7, caractérisée en ce que l'agent inhibiteur de la résistance multidroque est associé à un véhicule particulaire.

9. Composition selon la revendication 8, caractérisée en ce que le véhicule particulaire est une microcapsule, une nanocapsule, une micoparticule ou une nanoparticule.

10. Composition selon la revendication 8, caractérisée en ce que le véhicule particulaire est un liposome.

2081343

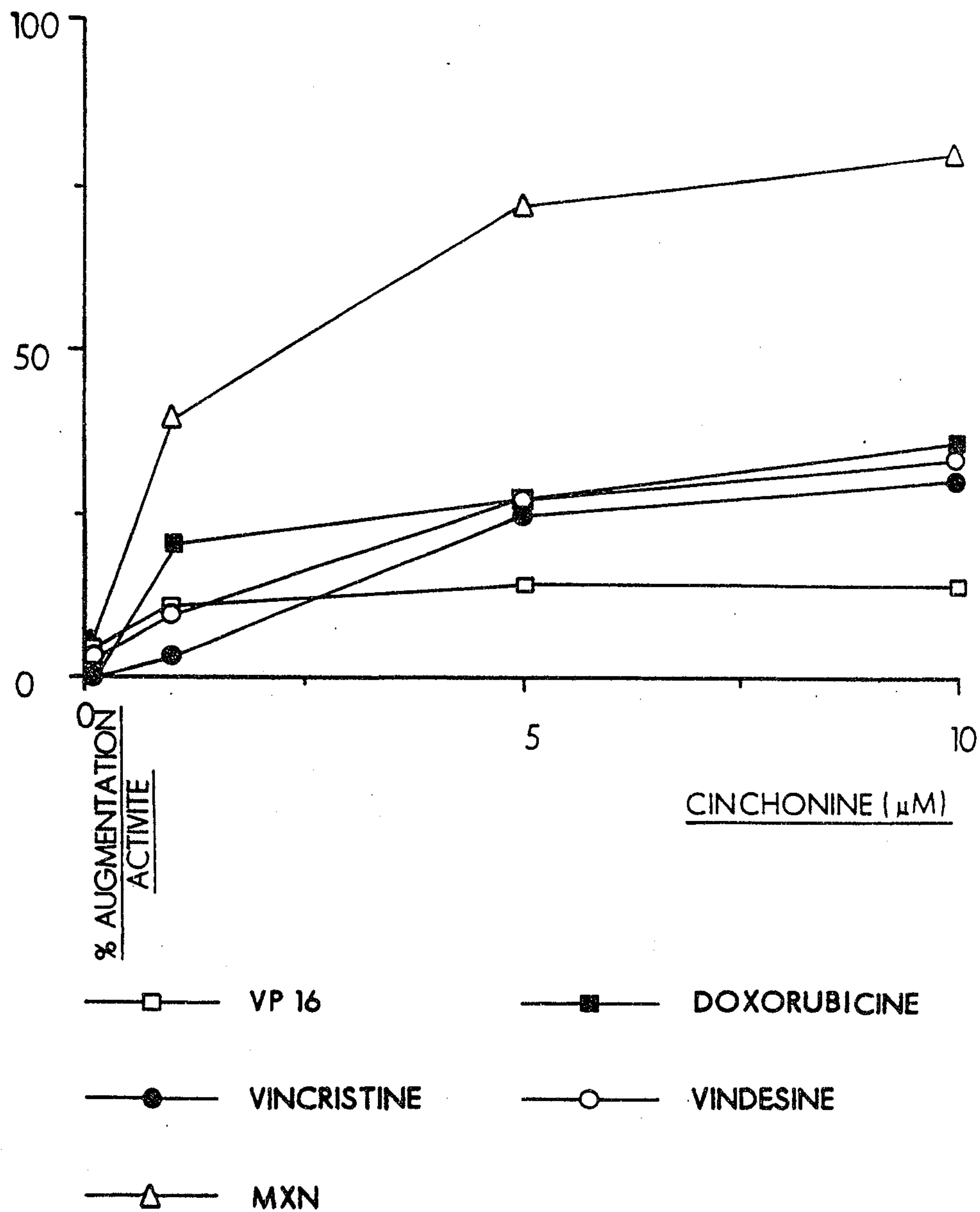


FIG. 1

2081343

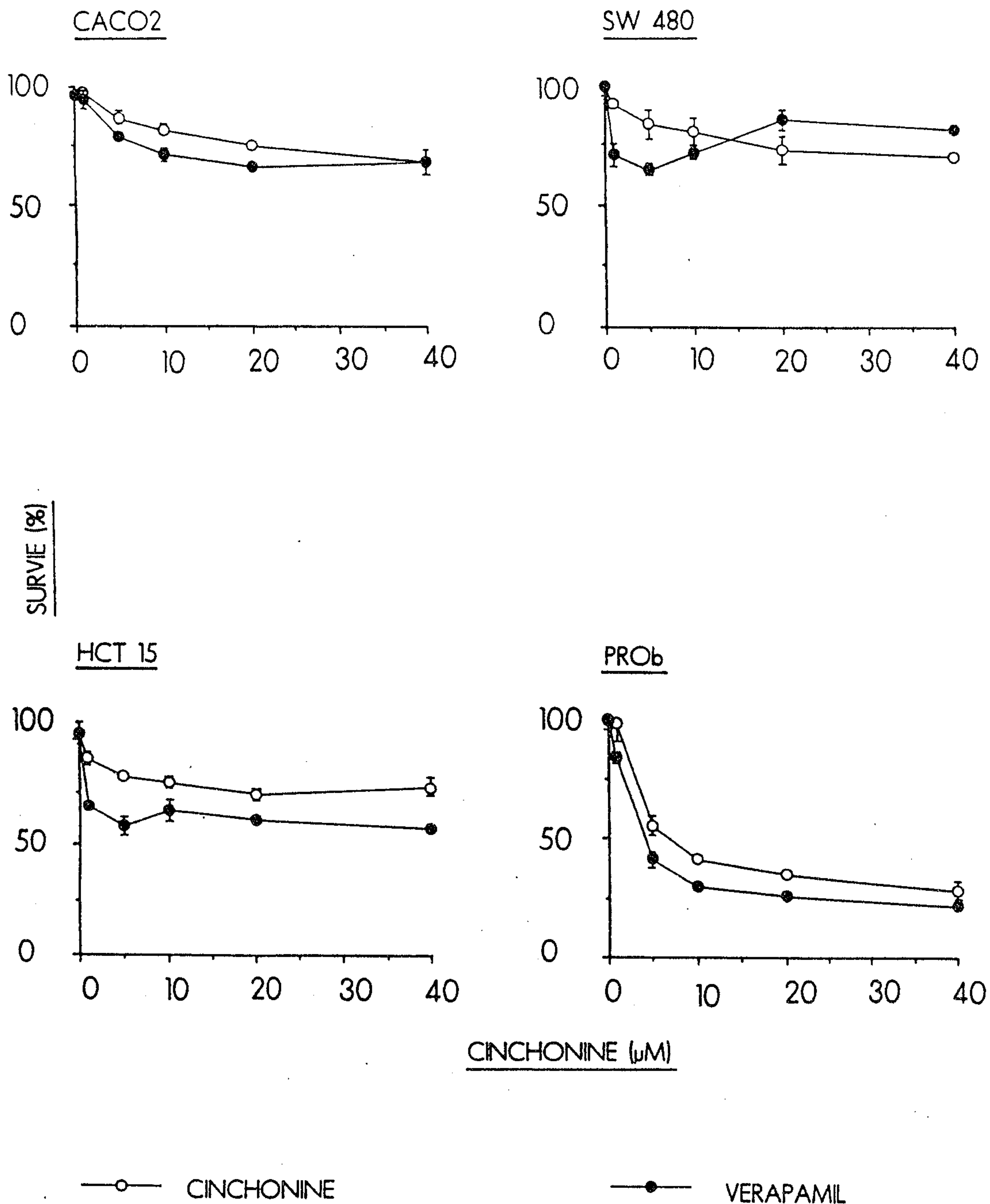


FIG. 2

2081343

