

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 17.10.89.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 19.04.91 Bulletin 91/16.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *ROUSSEL-UCLAF Société anonyme
à Directoire et Conseil de Surveillance — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : Brandely Maud et Maraninchi
Dominique.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Bourgouin André Roussel-Uclaf.

⑤4 Utilisation d'un polypeptide ayant l'activité de l'interleukine 2 humaine pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement des leucémies.

⑤7 Utilisation d'un polypeptide ayant l'activité de l'interleukine 2 humaine pour préparer une composition pharmaceutique destinée au traitement des leucémies.

FR 2 653 020 - A1



L'interleukine 2 (IL₂) qui est une lymphokine produite par les lymphocytes T activés possède une activité immunomodulatrice et une activité antitumorale décrites par exemple par Fletcher, M. et al. (Lymphokine Research 6 (1987) 47-57),
5 activités qui comprennent en particulier la capacité d'initier la prolifération des lymphocytes T et l'induction de la cytotoxicité des cellules NK (natural killer) et des cellules LAK (lymphokine activated killer). On a observé que l'administration de l'IL₂, soit seule à haute dose, soit associée avec des
10 cellules LAK, est capable d'induire la régression de certains cancers établis chez la souris et chez des patients ayant des cancers métastatiques tel que le mélanome, le cancer du rein, le cancer colorectal ou le lymphome non Hodgkinien (Rosenberg, S. A. et al. N. Engl. J. Med. (1987) 316 889-897).

15 Aucun résultat clinique n'a montré l'efficacité de la thérapie avec l'IL₂ seule ou associée avec une immunothérapie adoptive dans les diverses leucémies chroniques ou aiguës connues, notamment dans la leucémie myéloïde aiguë (LMA). Les phénomènes de dysrégulation aboutissant à la prolifération
20 des cellules leucémiques sont complexes. On admet généralement que leur contrôle nécessiterait l'utilisation en association de différents facteurs de différenciation, notamment l'utilisation de l'IL₂ avec par exemple un interféron, le facteur de nécrose tumorale, une autre interleukine ou d'autres facteurs
25 de différenciation, comme décrit par exemple pour la leucémie lymphoïde chronique dans la demande de brevet WO 88/06991.

Il a été suggéré puis confirmé que l'IL₂ stimule in vitro de façon significative la prolifération de cellules blastiques de malades atteints de LMA (J. A. Carron et J. C. Cawley Br.
30 J. Haematol. 71 (1) (1989) 168).

Or la demanderesse vient d'obtenir de façon inattendue des résultats montrant que, dans certaines conditions d'utilisation l'IL₂ seule présente une activité thérapeutique sur la LMA.

35 L'invention concerne donc l'utilisation d'un polypeptide ayant l'activité de l'interleukine 2 humaine pour préparer une composition pharmaceutique destinée au traitement des leucémies. On entend par polypeptide ayant l'activité de l'IL₂ humaine, l'IL₂ humaine naturelle, l'IL₂ humaine recombinante,

c'est-à-dire obtenue par la technologie de l'ADN recombinant, par exemple comme cela est décrit par Taniguchi, T. et al. (Nature (1983) 302 305-310) ou dans le brevet EP 91530 B, des allèles ou des dérivés de ces produits tels que décrits par
5 exemple par Ju, C. et al. (J. Biol. Chem. (1987) 262 5723-5731). Les leucémies que concerne l'invention comprennent les leucémies myéloïde ou lymphoïde chroniques et les leucémies aiguës lymphoïde ou non lymphoblastique par exemple les leucémies myéloïdes d'une façon générale caractérisées par la
10 prolifération des cellules blastiques.

L'invention a notamment pour objet l'utilisation caractérisée en ce que la leucémie est une leucémie myéloïde aiguë, diagnostiquée par les examens histologique, cytologique et biologique usuels. L'utilisation selon l'invention est des-
15 tinée au traitement de la LMA, au traitement de la rechute de celle-ci ou au traitement préventif de la rechute. L'invention décrit l'utilisation de l'IL₂ dans un traitement dont l'efficacité est montrée par un taux de réponse d'environ 20 % chez des malades atteints de LMA soit réfractaires à la chimiothérapie conventionnelle, soit en rechute après la chimiothérapie
20 ou après une greffe de moelle osseuse.

L'invention a particulièrement pour objet l'utilisation caractérisée en ce que l'IL₂ humaine est une IL₂ recombinante pure. Les compositions pharmaceutiques préparées selon
25 l'invention renferment une IL₂ humaine recombinante, des allèles ou des dérivés de celle-ci, telle que décrite ci-dessus, pour laquelle on utilise des techniques de purification connues de l'homme de métier, qui permettent de préparer des produits purs.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation caractérisée en ce que l'IL₂ est une IL₂ recombinante non glycosylée sous forme réduite. L'IL₂ non glycosylée utilisée est notamment celle ayant la séquence de l'IL₂ naturelle à 133 aminoacides avec éventuellement une Méthionine N-terminale
30 supplémentaire, dont les 3 cystéines en position 58, 105 et 125 sont sous la forme réduite, manifestant une activité biologique comparable à celle de l'IL₂ oxydée ayant la même séquence comportant un pont disulfure en position 58-105. Un exemple de préparation de l'IL₂ réduite à partir d'une souche
35

d'E. coli est donné plus loin dans la partie expérimentale. Par forme réduite, on entend que les restes cystéines que contient l'IL₂ renferment un groupement sulfhydryle libre dont la détermination est faite, par exemple, par spectrophotométrie avec la dithiodipyridine comme réactif des thiols. L'activité biologique est déterminée par mesure de la prolifération de lignées cellulaires leucémiques de souris dépendantes de l'IL₂, CTLL-2, avec un test colorimétrique au sel de tétrazolium (Mossmann, T. J. Immunol. Meth (1983) 65 55-63).

10 L'activité spécifique des IL₂ recombinantes utilisées dans l'invention est au moins égale à $0,5 \times 10^6$ U BRMP/mg, de préférence 1×10^7 U BRMP/mg. L'unité d'activité IL₂ est définie comme la quantité qui produit 50 % de la réponse maximum dans le test. On utilise comme standard un échantillon

15 "Biological Response Modifier Programm (BRMP) reference agent human IL₂ (jurkat)" fourni par le National Cancer Institute (NCI).

L'invention a spécialement pour objet l'utilisation caractérisée en ce que l'IL₂ est administrée par voie intraveineuse en bolus lent à la dose de 2 à 20×10^6 U/M² par injection, de préférence 3 à 10×10^6 U/M² et plus spécialement celle caractérisée en ce que l'IL₂ est administrée à la dose de 8×10^6 U/M² par injection. L'invention a tout spécialement pour objet l'utilisation caractérisée en ce que l'IL₂ est

25 administrée de façon répétée au moins 2 fois par jour par cycle de plusieurs jours par semaine et caractérisée en ce que l'IL₂ est administrée de façon répétée pendant au moins 3 semaines non consécutives. La dose administrée, la fréquence de l'injection et la durée du traitement varient en fonction

30 de l'état du malade. La dose journalière est généralement comprise entre 2×10^6 U/M²/24h et 30×10^6 U/M₂/24 h, de préférence de l'ordre de 20×10^6 U/M²/24h par cycle de plusieurs jours chez l'adulte ou l'enfant. L'IL₂ est comprise dans une composition pharmaceutique, de préférence lyophilisée

35 en flacon-dose contenant de 0,1 à 2 mg de principe actif et que l'on reconstitue avec de l'eau distillée pour injection. La solution obtenue est immédiatement diluée à l'aide d'un soluté, par exemple le chlorure de sodium à 0,9 % ou le glucose à 5 % pour l'administration en bolus lent. Par bolus

lent, on entend une perfusion de courte durée par exemple de 15 mn. Selon l'utilisation préférée de l'invention, l'IL₂ est l'IL₂ recombinante réduite dont la préparation est donnée plus loin ainsi qu'un exemple de préparation pharmaceutique, la dose est de 8×10^6 U/M² par injection, la fréquence de l'injection est de toutes les 8 heures (3 doses/jour) ou toutes les 12 heures (2 doses/jour) selon un cycle de 5 jours consécutifs, la durée de l'administration est de 3 semaines non consécutives, représentant environ 360×10^6 U/M² et 36 mg administrés au total chez le malade par voie intraveineuse en bolus lent de 15 minutes.

Toutes les publications qui sont citées sont incorporées, par référence, dans le texte de la présente demande.

Les figures ci-annexées illustrent la préparation décrite plus loin :

- la figure 1a est un chromatogramme de RP-HPLC analytique de l'extrait brut en guanidine 8M de la préparation.
- la figure 1b est un chromatogramme de RP-HPLC analytique des IL₂ standard réduite et oxydée.
- la figure 2 est un chromatogramme de RP-HPLC analytique de la "resolubilisation" de la préparation.
- la figure 3 est un chromatogramme de RP-HPLC de la "fraction principale" de la préparation.
- la figure 4 est un chromatogramme de RP-HPLC analytique de la fraction "59" de la préparation.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois la limiter :

Préparation de l'IL₂ humaine recombinante (r-hIL₂) réduite :

L'IL₂ est préparée à partir de granules qui sont obtenus par centrifugation de cultures d'une souche d'E. coli transformée à l'aide d'un plasmide comprenant la séquence codant pour l'IL₂ native et capable d'accumuler l'IL₂ sous cette forme à l'intérieur des cellules, comme décrit par exemple par Sato, T. et al. (J. Biochem. (1987) 101 525-534). Les cellules ainsi obtenues d'un fermenteur de 10 litres sont soumises à un éclatement dans un homogénéisateur Manton Gaulin. A partir des débris cellulaires isolés et lavés (90-170 g en poids humide) l'IL₂ est solubilisée dans 2,5 volumes d'un tampon Tris, HCl 20 mM pH 8 contenant du chlorhydrate de guanidine (Gu, HCl)

8M et du Dithiothréitol (DTT) 100 mM. La quantité d'IL₂ solubilisée (1,5 à 2,5 g) est estimée par RP-HPLC analytique sur une colonne C4 VYDAC (0,46 x 15 cm) 300 Å, 5 microns, au débit de 2 cm³/mn, avec un gradient linéaire d'acétonitrile (30 à 70 % sur 10 minutes) contenant 0,1 % de TFA, une détection spectrophotométrique à 280 nm ou 210 nm, dont on évalue la surface du pic à 280 nm après calibration avec un standard d'IL₂ (fig. 1a et fig. 1b). L'IL₂ est ensuite précipitée par abaissement à 2M de la concentration en Gu, HCl, en présence de DTT. Après lavage du précipité à l'aide d'une solution aqueuse de TFA à 0,1 % jusqu'à obtention d'un pH du surnageant inférieur à 5,0, l'IL₂ est solubilisée dans une solution aqueuse à 20 % d'acétonitrile et 0,1 % de TFA. La "resolubilisation" obtenue, qui renferme selon la RP-HPLC analytique (fig. 2) une teneur en IL₂ réduite supérieure à 85 %, a une activité biologique inférieure à 0,01 x 10⁷ U/mg d'IL₂ réduite et une teneur en groupements sulfhydryles de 2,85 SH/mole d'IL₂ réduite. Une fraction de la solution obtenue, correspondant à environ 200 mg d'IL₂ estimée par RP-HPLC analytique, est diluée de façon à ajuster la concentration en acétonitrile inférieure à 10 % dans du TFA à 0,1 %, puis appliquée à une colonne C4 VYDAC (5,7 x 30 cm). L'IL₂ est éluée au débit de 100 cm³/mn, à l'aide d'un gradient linéaire d'acétonitrile (30 à 80 % sur 40 minutes) contenant 0,1 % de TFA, à une concentration d'environ 60 % en acétonitrile dans un pic majeur détecté par spectrophotométrie à 280 nm et analysé par RP-HPLC. La "fraction principale" recueillie qui renferme l'IL₂ réduite est diluée immédiatement par 2 volumes de solution aqueuse d'acide citrique à 0,5 % et appliquée à une colonne C4 VYDAC (5,7 x 30 cm) que l'on développe avec un gradient linéaire d'isopropanol (20 à 70 % sur 40 minutes) contenant 0,5 % d'acide citrique, au débit de 50 cm³/mn. L'effluent, suivi par spectrophotométrie à 280 nm, montre l'élution successive d'un pic mineur à une concentration d'environ 48 % en isopropanol (fraction "48") et d'un pic majeur à une concentration d'environ 59 % en isopropanol (fraction "59") (fig. 3). La fraction "59" est recueillie. Elle est stable à la conservation à 0°C pendant au moins 24 h, à l'abri de l'air.

Après élimination de l'isopropanol par distillation azéotrope sous vide, la fraction "59" est analysée en RP-HPLC analytique et donne un pic homogène (fig. 4) élué à environ 60 % d'acétonitrile alors que l'IL₂ oxydée de référence est élue à environ 57 % d'acétonitrile (fig. 1b). La fraction "59" qui, après élimination de l'isopropanol, a une concentration en IL₂ supérieure à 1 mg/cm³ et un pH de 3 ± 0,5, peut être conservée à +4°C, à l'abri de l'air, pendant au moins une semaine ou être immédiatement lyophilisée ou formulée pour l'obtention d'une composition pharmaceutique. La fraction "59" lyophilisée est dosée en activité biologique, selon le test in vitro de prolifération de cellules CTLL-2, et a une activité spécifique de 1,3 ± 0,5 x 10⁷ U/mg comparable à celle de l'IL₂ native.

La teneur en groupements sulfhydryles libres de la fraction "59" lyophilisée, déterminée par la méthode colorimétrique à la dithiodipyridine, est de 2,94 SH/mole comparativement à 0,76 SH/mole pour l'IL₂ oxydée de référence.

150 à 300 mg titrés par RP-HPLC analytique de r-hIL₂ réduite, contenant 3 groupements SH, biologiquement active, homogène en RP-HPLC, sont obtenus dans la fraction "59" à partir d'un fermenteur de 10 litres.

EXEMPLE 1 : Composition pharmaceutique pour perfusion.

On a réalisé une préparation pour injection par voie intraveineuse en perfusion de formule :

	IL ₂ réduite	0,5 mg
	acide citrique	5 mg
30	mannitol	50 mg
	eau stérile	1 cm ³
	glucose à 5 %	50 cm ³

EXEMPLE 2 : Etude clinique dans le traitement de la LMA.

L'étude inclut des malades ayant une LMA primitive de diagnostic cytologique (type M1 à M5 selon la classification FAB) pour laquelle ils ont eu une chimiothérapie d'induction suivie soit d'une chimiothérapie de maintenance, soit d'une greffe de moelle osseuse autologue (noté GDMA) et dont un

diagnostic ultérieur a établi la rechute ou le caractère réfractaire à la chimiothérapie, évalué sur la présence de plus de 10 % de blastes dans deux prélèvements de moelle osseuse réalisés au moins à 1 semaine d'intervalle, par exemple à 2 semaines d'intervalle.

- 5 Les compositions d'IL₂ préparées selon l'invention permettent d'injecter des doses de 8×10^6 U/M², soit 0,8 mg/M² par injection, à raison d'une injection toutes les 8 heures pendant 5 jours consécutifs de la première semaine, puis la même
- 10 dose que ci-dessus à raison d'une injection toutes les 12 heures pendant 5 jours consécutifs de la troisième semaine et de la cinquième semaine, par voie intraveineuse en bolus lent de 15 minutes. On utilise les compositions décrites à l'exemple 1.
- 15 L'évaluation des malades est faite avant et après le traitement à l'IL₂ sur les prélèvements de moelle osseuse par détermination du pourcentage de blastes et évaluation de l'état de différenciation des précurseurs médullaires.

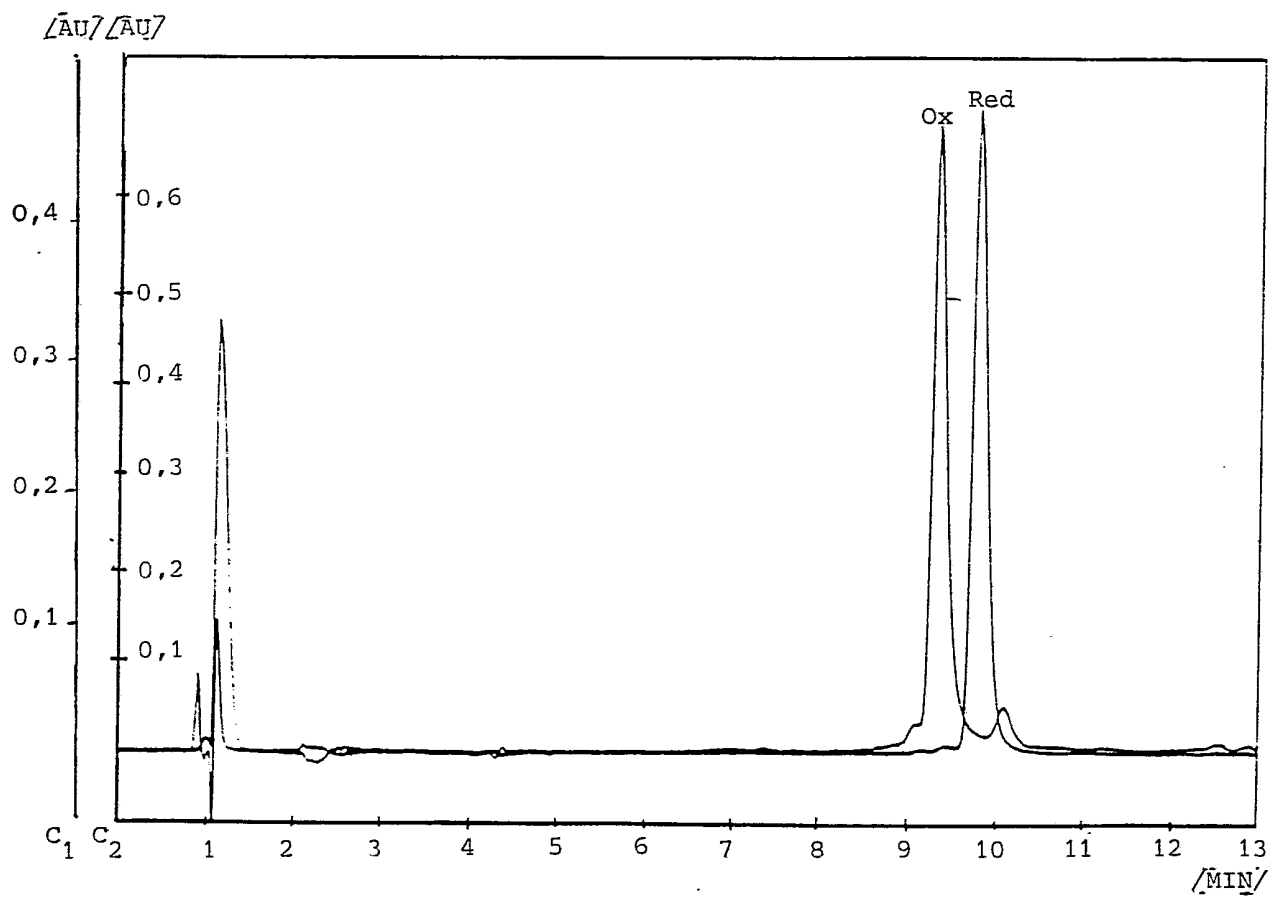
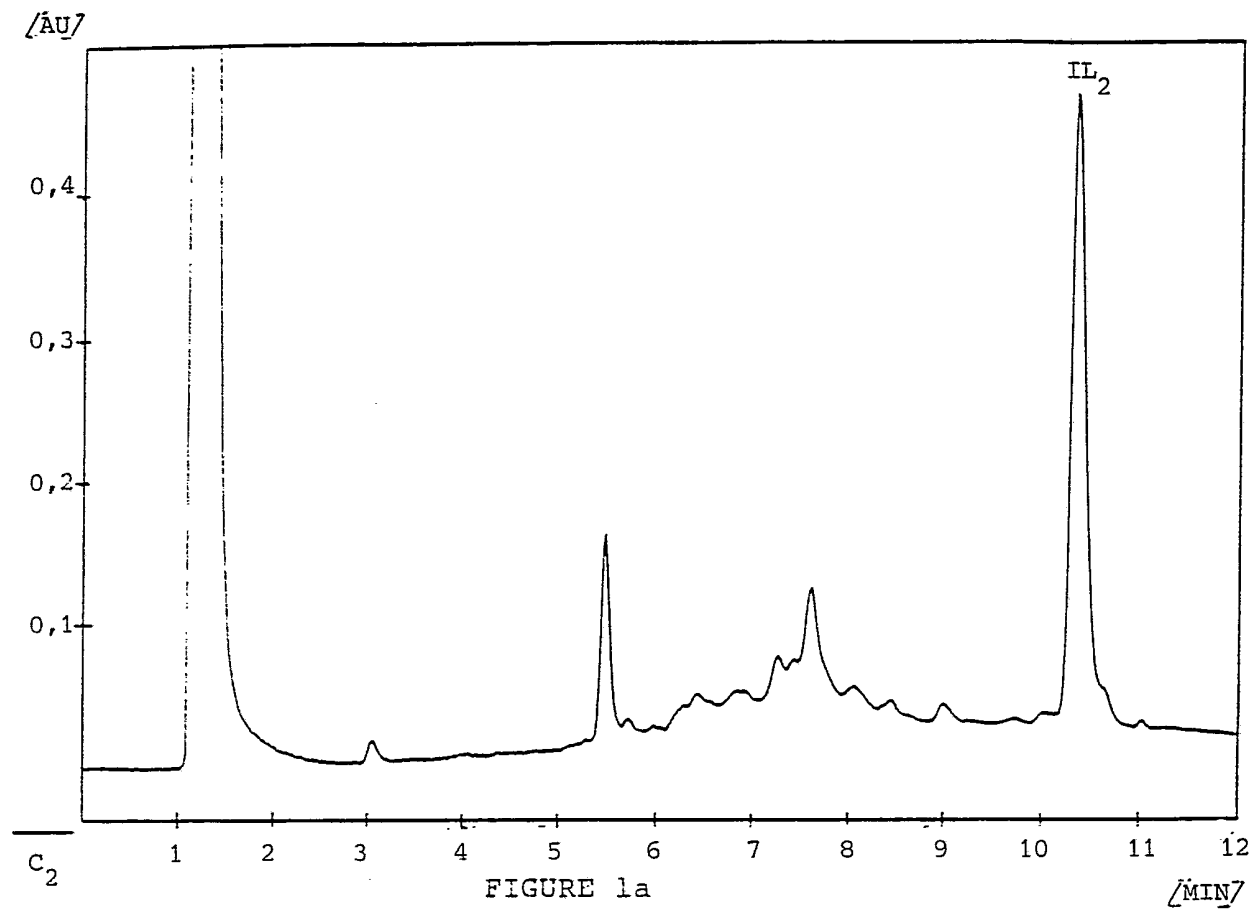
20 Sur 11 malades réévalués, les réponses suivantes ont été obtenues :

Patient	Age	Sexe	Type	Etat hématologique à l'inclusion	% de blastes médullaires après IL2 (J0 - J8 - J14 - J36)	Réponse
1	68	H	M5	1ère rechute sous chimio	30 4 2 0	RC
2	17	F	M5	Résistance primaire	85 83 80	échec
3	60	H	M5	2ème rechute résistant à la chimio	42 24 43 16	échec
4	5	H	M5	3ème rechute après GDMA	81 3 ND 0	RC
5	56	H	M4	1ère rechute sous chimio	13 ND 19 60	échec
6	25	H	M2	1ère rechute sous chimio	14 ND ND 0	échec
7	45	H	M4	Résistance primaire	75 ND 22 83	échec
8	28	H	M4	1ère rechute après GDMA	61 89 57 70	échec
9	53	F	M1	1ère rechute résistant à la chimio	83 74 93 92	échec
10	59	F	M4	1ère rechute après GDMA	80 74 89 ND	échec
11	39	H	M1	1ère rechute sous chimio	44 38 64 70	échec

Les résultats montrent 2 réponses complètes (RC), soit un taux de réponse de 20 %. Parmi les échecs, 2 malades (patients n° 3 et n° 7) présentent une diminution significative du pourcentage des blastes médullaires.

REVENDICATIONS

- 1) Utilisation d'un polypeptide ayant l'activité de l'inter-leukine 2 humaine pour préparer une composition pharmaceutique destinée au traitement des leucémies.
- 5 2) Utilisation selon la revendication 1 caractérisée en ce que la leucémie est une leucémie myéloïde aiguë.
- 3) Utilisation selon la revendication 2 caractérisée en ce que l'IL₂ humaine est une IL₂ recombinante pure.
- 4) Utilisation selon la revendication 3 caractérisée en ce que
- 10 l'IL₂ est une IL₂ recombinante non glycosylée sous forme réduite.
- 5) Utilisation selon la revendication 3 ou 4 caractérisée en ce que l'IL₂ est administrée par voie intraveineuse en bolus lent à la dose de 2 à 20 x 10⁶ U/M² par injection.
- 15 6) Utilisation selon la revendication 5 caractérisée en ce que l'IL₂ est administrée à la dose de 8 x 10⁶ U/M² par injection.
- 7) Utilisation selon la revendication 6 caractérisée en ce que l'IL₂ est administrée de façon répétée au moins 2 fois par jour par cycle de plusieurs jours par semaine.
- 20 8) Utilisation selon la revendication 7 caractérisée en ce que l'IL₂ est administrée de façon répétée pendant au moins 3 semaines non consécutives.



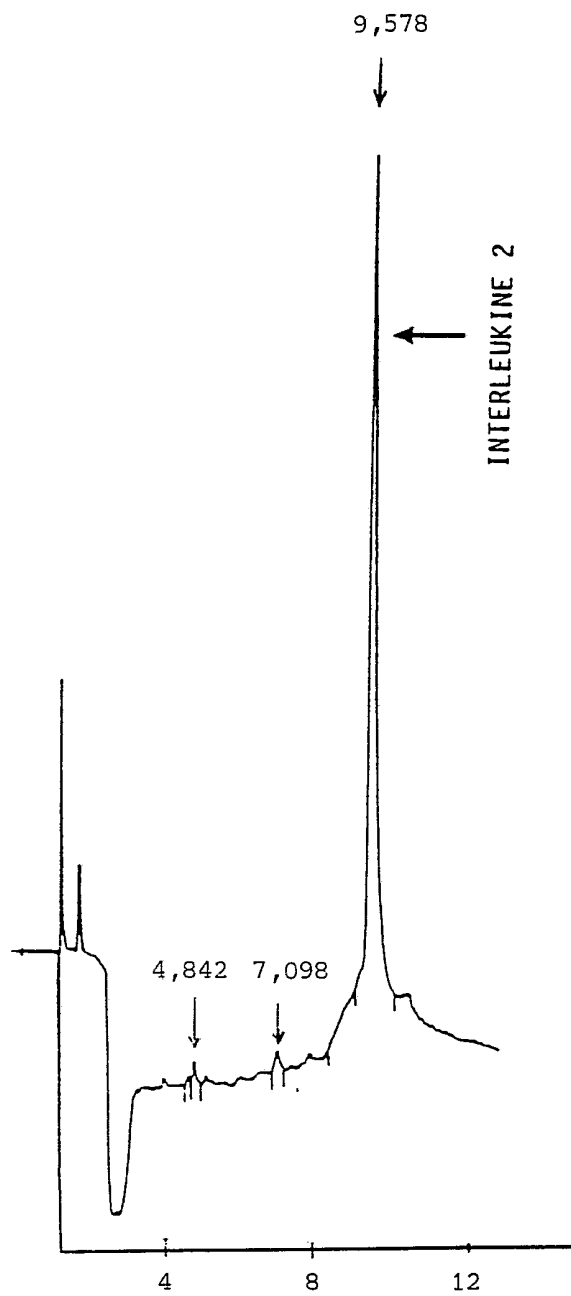


FIGURE 2

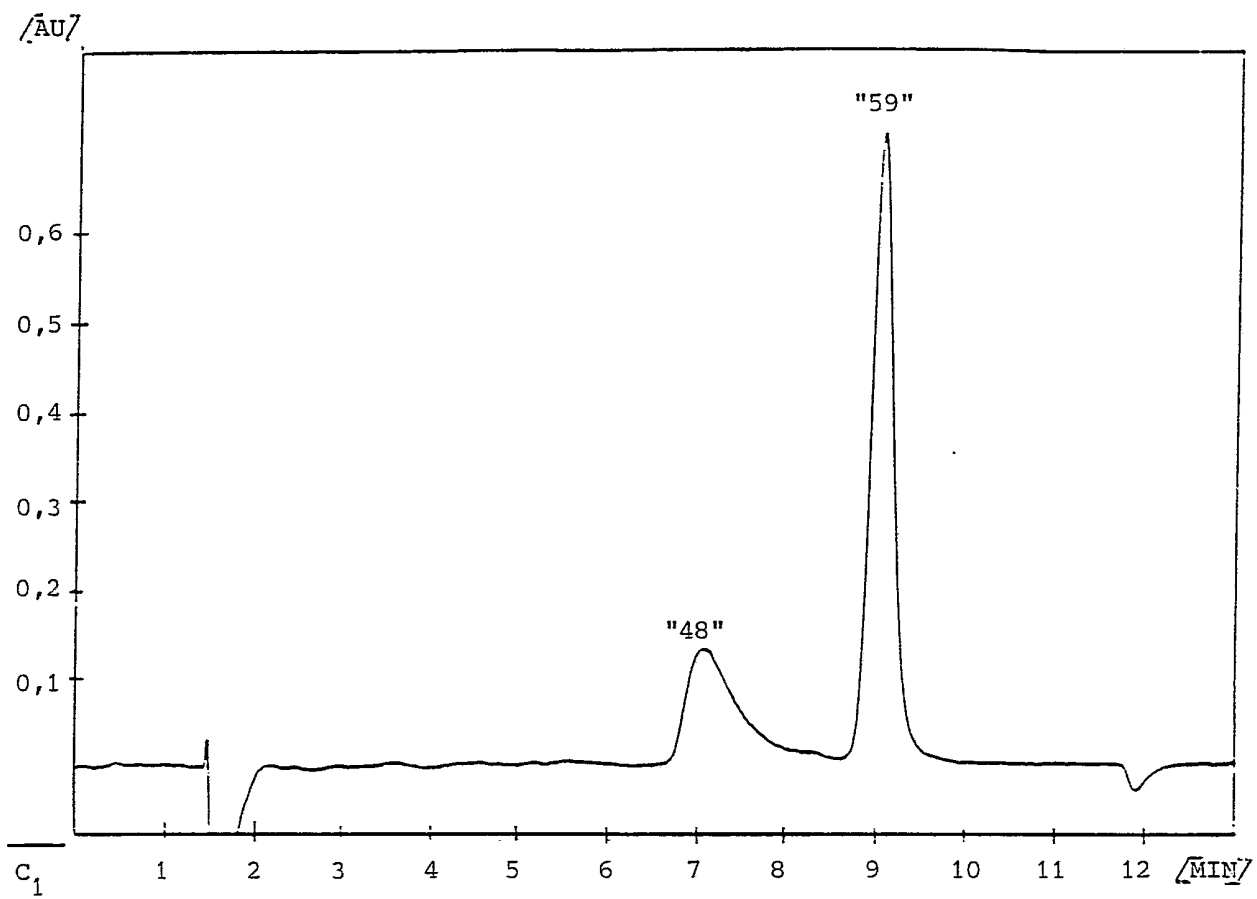


FIGURE 3

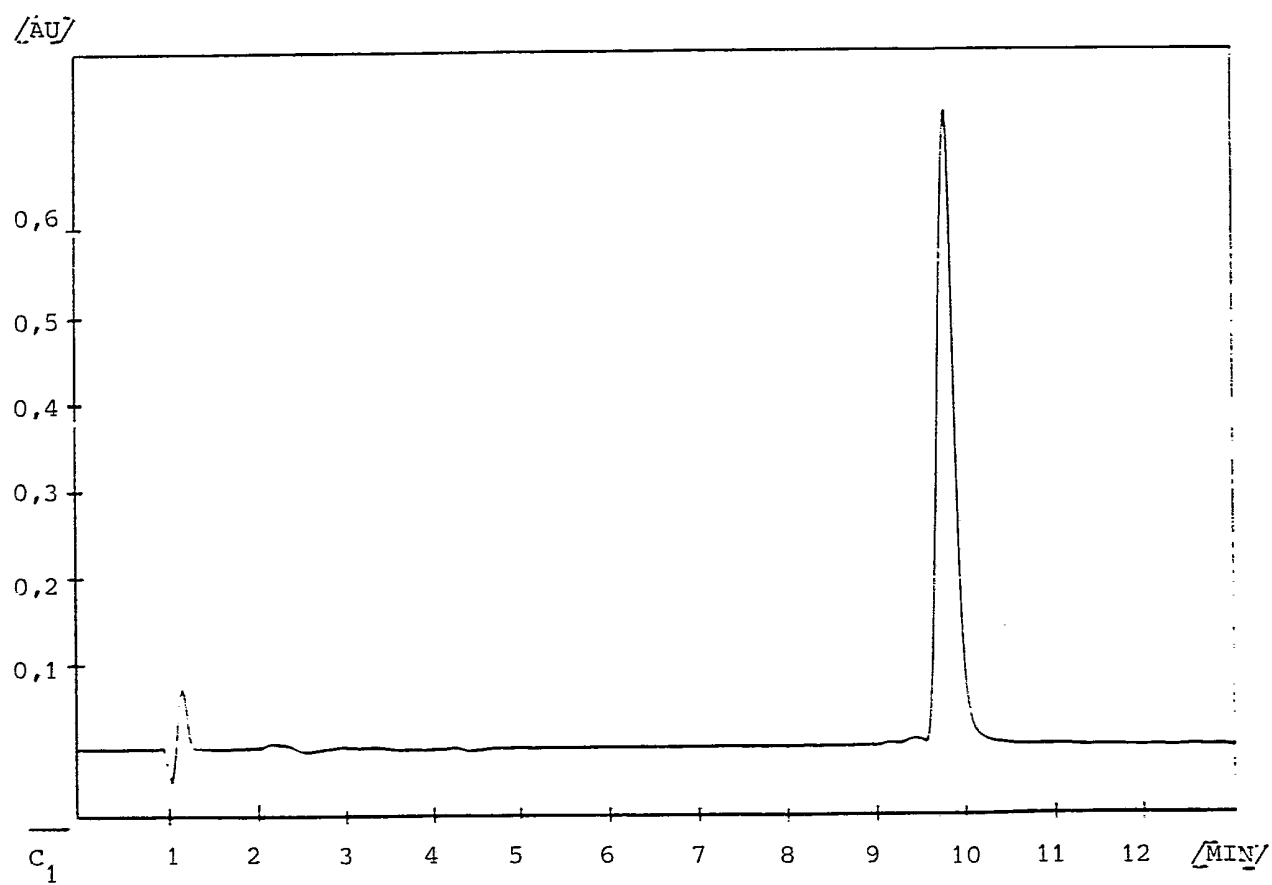


FIGURE 4

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FR 8913546
FA 433469

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X,D	LYMPHOKINE RESEARCH, vol. 6, no. 1, 1987, pages 47-57, Mary Ann Liebert, Inc., Publishers; M. FLETCHER et al.: "Recent advances in the understanding of the biochemistry and clinical pharmacology of interleukin-2" * En entier, particulièrement pages 51-52: "Pharmacological uses of IL-2" *	1-8
X	CANCER TREATMENT REVIEW, vol. 16, suppl. A, juin 1989, pages 5-13, Academic Press Ltd; R.K. OLDHAM et al.: "IL-2: a review of current knowledge" * En entier, particulièrement page 12: "Summary" *	1-8
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		A 61 K 37/00
Date d'achèvement de la recherche 26-06-1990		Examineur ISERT B.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		