



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 1991/02/06
 (87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 1991/08/22
 (45) Date de délivrance/Issue Date: 2002/07/30
 (85) Entrée phase nationale/National Entry: 1992/08/04
 (86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 1991/000092
 (87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 1991/012011
 (30) Priorité/Priority: 1990/02/06 (90/01343) FR

(51) Cl.Int.⁵/Int.Cl.⁵ A61K 31/72, A61K 31/735
 (72) Inventeurs/Inventors:
 Jozefowicz, Jacqueline, FR;
 Harmand, Marie-Françoise, FR;
 Slaoui, Faouzi, FR
 (73) Propriétaire/Owner:
 Therapeutiques Substitutives, FR
 (74) Agent: GOUDREAU GAGE DUBUC

(54) Titre : NOUVEL AGENT ANTITUMORAL DERIVE DU DEXTRANE
 (54) Title: ANTI-TUMOR AGENT DERIVED FROM DEXTRANE

(57) **Abrégé/Abstract:**

L'invention est relative à un agent inhibiteur de la croissance des cellules tumorales, comprenant un dérivé de dextrane constitué par une chaîne polysaccharidique substituée par des groupes carboxyméthyle et carboxyméthylbenzylamide sulfonate, lequel dérivé est désigné par la formule générale $D_X C_M Y B S_Z$ dans laquelle X représente le nombre moyen d'unités saccharidiques non substituées pour 100 unités saccharidiques, Y représente le nombre moyen de groupes carboxyméthyle pour 100 unités saccharidiques, Z représente le nombre moyen de groupes carboxyméthylbenzylamide sulfonate pour 100 unités saccharidiques, lequel agent est caractérisé en ce que X est inférieur ou égal à 50, Y est compris entre 10 et 90, et Z est compris entre 15 et 35.



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

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : A61K 31/72, 31/735	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 91/12011 (43) Date de publication internationale: 22 août 1991 (22.08.91)
<p style="text-align: center; font-size: 1.5em; margin: 0;">2075291</p> (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR91/00092 (22) Date de dépôt international: 6 février 1991 (06.02.91) (30) Données relatives à la priorité: 90/01343 6 février 1990 (06.02.90) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): THERAPEUTIQUES SUBSTITUTIVES [FR/FR]; Université Paris-Nord - CSP - LRM, Avenue J.B. Clément, F-93430 Villetaneuse (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : JOZEFOWICZ, Jacqueline [FR/FR]; 65, deuxième avenue, F-60260 Lamorlaye (FR). HARMAND, Marie-Françoise [FR/FR]; 26, rue Berruer, F-33000 Bordeaux (FR). SLAOUI, Faouzi [MA/MA]; 23, boulevard Mohammed V, Meknes (MA).		(74) Mandataires: ORES, Irène etc. ; Cabinet Ores, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), 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), 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: NOVEL ANTI-TUMORAL AGENT DERIVED FROM DEXTRAN

(54) Titre: NOUVEL AGENT ANTITUMORAL DERIVE DU DEXTRANE

(57) Abstract

An agent for inhibiting the growth of tumor cells, comprising a dextran derivative consisting of a polysaccharide chain substituted with carboxymethyl and carboxymethylbenzylamide sulphonate groups, said derivative being designated by general formula ($D_XCM_YBS_Z$), wherein X represents the average number of unsubstituted saccharide units per 100 saccharide units, Y represents the average number of carboxymethyl groups per 100 saccharide units, and Z represents the average number of carboxymethylbenzylamide sulphonate groups per 100 saccharide units. Said agent is characterized in that X is equal to or lower than 50, Y is between 10 and 90, and Z is between 15 and 35.

(57) Abrégé

X

L'invention est relative à un agent inhibiteur de la croissance des cellules tumorales, comprenant un dérivé de dextrane constitué par une chaîne polysaccharidique substituée par des groupes carboxyméthyle et carboxyméthylbenzylamide sulfonate, lequel dérivé est désigné par la formule générale $D_XCM_YBS_Z$ dans laquelle X représente le nombre moyen d'unités saccharidiques non substituées pour 100 unités saccharidiques, Y représente le nombre moyen de groupes carboxyméthyle pour 100 unités saccharidiques, Z représente le nombre moyen de groupes carboxyméthylbenzylamide sulfonate pour 100 unités saccharidiques, lequel agent est caractérisé en ce que X est inférieur ou égal à 50, Y est compris entre 10 et 90, et Z est compris entre 15 et 35.

NOUVEL AGENT ANTITUMORAL DERIVE DU DEXTRANE

La présente invention est relative à des agents inhibant la croissance des cellules tumorales, et à leur application pour l'obtention de médicaments antitumoraux.

5 Il existe plusieurs substances, d'origine et de composition variées, qui possèdent une activité anti-tumorale ; toutefois, la grande diversité des tumeurs existantes d'une part, et d'autre part les effets secondaires desdites substances, qui découlent de leur toxicité souvent importante vis-à-vis des cellules saines, et
10 les variations qui peuvent exister d'une tumeur à l'autre, et d'un individu à l'autre dans la réponse à un traitement par une substance donnée, impliquent la nécessité de disposer de produits antitumoraux très variés, permettant des traitements adaptables à chaque cas. S'il
15 existe actuellement plusieurs médicaments dotés d'effet antitumoraux (une quarantaine de substances sont aujourd'hui utilisées à cet effet), trop nombreux sont encore les médicaments dont l'efficacité est insuffisante
20 ou aléatoire. La mise au point de nouveaux agents antitumoraux présente donc un intérêt thérapeutique considérable.

D'autre part, il est connu, par exemple par le Brevet Français 2 461 724, et le Brevet français
25 2 555 589, que la substitution de polymères tels que les dextrans par des chaînes latérales portant des groupes carboxyliques et sulfonate, leur confère des propriétés anticoagulantes.

Les Inventeurs ont maintenant mis en évidence
30 de nouvelles propriétés de certains dextrans substitués par des chaînes latérales portant des groupes carboxyliques et sulfonate ; ils ont en effet découvert que pour certaines valeurs de taux de substitution par lesdits groupes, lesdits dextrans substitués s'avéraient de
35 bons inhibiteurs de la croissance des cellules tumorales,

2075291

2

n'ayant en outre que peu ou pas d'effet sur la croissance des cellules saines.

La présente invention a pour objet un agent inhibiteur de la croissance des cellules tumorales, comprenant un dérivé de dextrane constitué par une chaîne polysaccharidique substituée par des groupes carboxyméthyle et carboxyméthylbenzylamide sulfonate, lequel dérivé est désigné par la formule générale $D_X C_M Y B S_Z$ dans laquelle

10 X représente le nombre moyen d'unités saccharidiques non substituées pour 100 unités saccharidiques,

Y représente le nombre moyen de groupes carboxyméthyle pour 100 unités saccharidiques,

15 Z représente le nombre moyen de groupes carboxyméthylbenzylamide sulfonate pour 100 unités saccharidiques,

lequel agent est caractérisé en ce que X est inférieur ou égal à 50, Y est compris entre 10 et 90, et 20 Z est compris entre 15 et 35.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, X est égal à 11, Y est égal à 60 et Z est égal à 29.

25 Selon un autre mode de réalisation préféré de la présente invention, X est égal à 47, Y est égal à 17 et Z est égal à 24.

La présente invention a également pour objet l'application des dextrans substitués définis plus haut à l'obtention de médicaments antitumoraux.

30 L'invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de préparation et d'utilisation des agents antitumoraux conformes à l'invention.

35 Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de

l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLES

I - PREPARATION DES AGENTS INHIBITEURS DE LA CROISSANCE DES CELLULES TUMORALES CONFORMES A L'INVENTION

Des dextrans fonctionnalisés par des groupes carboxyméthylbenzylamide sulfonate (DCMBS) sont préparés selon le procédé décrit dans la publication de MAUZAC et al. [Biomaterials, 3, (1982)], c'est à dire en 3 étapes :
10 carboxyméthylation du dextrane, couplage de la benzylamine sur les groupes carboxyméthyle, sulfonation des noyaux aromatiques des groupes carboxyméthyl-benzylamide.

Des dextrans fonctionnalisés par des groupes carboxyméthyle (DCM), et carboxyméthylbenzylamide (DCMB),
15 sont également préparés, afin de comparer leur activité antitumorale à celle des dérivés conformes à l'invention.

Des dextrans fonctionnalisés sont désignés par la formule générale $D_X C_M Y B_{Z'} S_Z$ dans laquelle

20 X représente le nombre moyen d'unités saccharidiques non substituées, pour 100 unités saccharidiques

Y représente le nombre moyen de groupes carboxyméthyl pour 100 unités saccharidiques

25 Z' représente le nombre moyen de groupes carboxyméthyl benzylamide pour 100 unités saccharidiques

Z représente le nombre moyen de groupes carboxyméthylbenzylamide sulfonate pour 100 saccharidiques.

30 Pour l'obtention des dextrans fonctionnalisés conformes à la présente invention, X doit être inférieur ou égal à 50, Y doit être compris entre 10 et 90, Z' doit être au plus égal à 5, et Z doit être compris entre 15 et 35.

2075291

4

Ces valeurs sont obtenues en faisant varier différents paramètres dans le procédé de préparation des dérivés de dextrane ; la façon de procéder au choix des conditions de chaque étape de la réaction est décrite
5 ci-après :

a) Carboxyméthylation

Dérivée de la réaction effectuée sur la cellulose pour obtenir la carboxyméthylcellulose, cette opération est réalisée en milieu basique par action à froid de
10 l'acide monochloroacétique ClCH_2COOH sur le dextrane $\text{Dx}(\text{OH})_3$. R, le rapport carboxyméthylant, est le nombre de moles d'acide monochloroacétique introduit dans le milieu réactionnel par motif de dextrane présent dans ce milieu. Ce rapport contrôle la réaction de carboxy-
15 méthylation, mais dans le cas du dextrane, il n'est pas possible d'utiliser des rapports carboxyméthylants élevés, au risque de dégrader la chaîne macromoléculaire du dextrane. Il est donc indispensable de procéder à des carboxyméthylations successives à des faibles valeurs de
20 R, (au plus égales à 3,5) pour arriver aux pourcentages de substitution souhaités lorsqu'ils sont élevés. Le temps de réaction et la température du milieu réactionnel ont aussi un effet sur le rendement de la réaction, c'est-à-dire sur le nombre de motifs dextranes portant un
25 groupe carboxyméthyle pour 100 motifs.

Pour une valeur de $R = 3,5$, à une température de 50°C , et pour un temps de réaction de 40 mn, on obtient un rendement de réaction de l'ordre de 60%.

Pour obtenir un polymère ayant un pourcentage
30 de substitution voisinant 100% en maintenant ces conditions de synthèse, il est indispensable de procéder à des carboxyméthylations successives. L'on peut ainsi atteindre des valeurs supérieures à 100% d'unités substituées sur deux de leurs fonctions hydroxyles. Toutefois,
35 à partir de la troisième étape de synthèse,

2075291

5

l'augmentation du pourcentage de substitution est faible puisqu'il est de 5 à 10% entre la troisième et la quatrième étape.

5 b) Couplage de la benzylamine sur les groupes carboxyméthyle :

Le principe de cette réaction classique est fondé sur l'aptitude de la fonction carboxylique à former un anhydride mixte instable capable de réagir avec un réactif portant une fonction amine primaire (R-NH₂). Deux
10 procédés différents communément dénommés réactions d'activation ont été utilisés pour aboutir à la formation d'un anhydride mixte :

- action du chloroformate d'isobutyle (CIB)
 - action du N-Ethoxycarbonyl-2-Ethoxy-1-2-Dihydroquinoléine (EEDQ).
- 15

Couplage au CIB

Le couplage proprement dit consiste alors à faire réagir l'amine primaire, en l'occurrence la benzylamine, sur la fonction anhydride mixte instable.

20 Cette réaction est effectuée dans un mélange eau/diméthylformamide (DMF). Les proportions 50/50 en volume eau/DMF ont été retenues car c'est le mélange qui pose le moins de problèmes de solubilité des réactifs et qui permet un bon rendement. Les rapports molaires :
25 CIB/-COOH, B/-COOH et NMM/-COOH retenus sont de 2.

L'activation doit être effectuée, à pH 3,5 pour empêcher le dextrane de précipiter, en un temps très rapide, et à faible température (1 minute à -15°C) puisque l'anhydride mixte, très instable, se décompose
30 par élévation de la température. La réaction de couplage est effectuée pendant 30 minutes à -15°C, puis 1 heure à 20°C. A la fin de la réaction, l'eau est éliminée par évaporation du milieu réactionnel puis le produit est précipité et purifié. Le carboxyméthylbenzylamide-dex-
35 trane (CMDB), ainsi synthétisé subira un deuxième et/ou

2075291

6

un troisième couplage pour améliorer le rendement de substitution.

Couplage à l'EEDQ

5 Dans ce cas, l'étape de couplage de la benzylamine est effectuée dans un mélange eau/éthanol de manière à assurer la solubilité du mélange. Le rapport eau/éthanol retenu est de 1,2:1 en volume.

10 La solution de EEDQ doit être ajoutée à la solution aqueuse de carboxyméthyl-dextrane sous agitation continue ; le pH est maintenu entre 3,5 et 4,5 à l'aide d'une solution d'HCl 1M ; l'agitation est maintenue pendant environ 30mn à température ambiante ; il est toutefois avantageux, si l'on souhaite obtenir un rendement de substitution élevé (jusqu'à 30%), d'opérer à une température de 30 à 40°C ce qui augmente l'activation du produit intermédiaire.

15 Un volume de benzylamine est alors ajouté au mélange, préalablement refroidi, si nécessaire, à une température d'environ 20°C ; le rapport molaire benzylamine/EEDQ est égal à 1. L'addition de soude est nécessaire au cours de la réaction pour maintenir le milieu basique et améliorer de ce fait le couplage en maintenant le pH apparent à une valeur voisine de 9. Cette opération est effectuée par contrôle continu du pH apparent avec une électrode de verre. La réaction est effectuée pendant une durée variant de 8 à 17 heures.

20 Les deux procédés de couplage donnent des pourcentages de substitution semblables avoisinant 8 à 12% en une seule étape. Dans le cas du couplage par l'EEDQ, ce rendement peut atteindre 25 à 30%, en une seule étape, lorsque l'on procède à l'activation du produit intermédiaire à une température de 30 à 40°C.

30 Comme pour la carboxyméthylation, lorsque les pourcentages de substitution de la benzylamine souhaités sont élevés, il n'est pas possible d'augmenter les

35

2075291

7

concentrations des différents réactifs. Il est donc nécessaire de faire des couplages successifs pour améliorer le rendement de la réaction. Le CMDB précipité lavé et séché après le premier couplage va subir un second et/ou un troisième couplage exactement dans les mêmes conditions que le premier sans considération des substitutions dues au premier couplage.

c) Sulfonation des noyaux aromatiques

Elle se fait par action de l'acide monochlorosulfonique sur le CMDB en milieu organique anhydre (dichlorométhane par exemple) et en phase hétérogène, le CMDB n'étant pas soluble dans le dichlorométhane. Il est nécessaire d'opérer la réaction en excès d'acide monochlorosulfonique sans pour autant risquer, d'une part, une hydrolyse acide de la chaîne polysaccharidique et, d'autre part, une sulfonation des fonctions hydroxyle portées par les unités glucosyles, qui donnerait des fonctions sulfate. Le rapport molaire $R' = [\text{HSO}_3\text{Cl}] / [\text{benzylamide}]$ où la concentration molaire en benzylamide [benzylamide] est celle de la benzylamide, fixée au polymère qui subit la réaction de sulfonation, doit être égal à 3. La concentration de l'acide chlorosulfonique dans le milieu réactionnel ne doit pas dépasser 0,15 M.

Dans ces conditions, le pourcentage d'unités portant une fonction sulfonate dépend du pourcentage d'unités substituées par des groupes benzylamide.

En effet, plus le dextrane est riche en fonctions benzylamide, meilleur est le rendement de la sulfonation. Ainsi, il est possible d'obtenir des dérivés dont le pourcentage d'unités portant la fonction sulfonate est de 35% quand le CMDB sur lequel la sulfonation a été effectuée présente près de 35% d'unités saccharidiques portant une fonction benzylamide.

2075291

En effet, aux conditions de concentration précédemment décrites les fonctions sulfonate se fixent préférentiellement sur les noyaux aromatiques des fonctions benzylamide et non pas au niveau des fonctions hydroxyle présentes sur le cycle des dextrans.

Les sulfonatations successives, au-delà de la deuxième ou de la troisième selon les cas, n'améliorent pas le rendement de la substitution mais, au contraire, entraînent une dégradation du polymère.

II - COMPARAISON DES EFFETS DES AGENTS ANTITUMORAUX CONFORMES A L'INVENTION, ET DE DIFFERENTS DERIVES DE POLYSACCHARIDES SUR LA CROISSANCE DE LIGNEES CELLULAIRES TUMORALES ("CHONDROCYTES" ISSUS DE CHONDROSARCOME HUMAIN).

Les effets des agents antitumoraux conformes à l'invention ont été étudiés en comparaison avec, d'une part, ceux de polysaccharides non sulfatés : le dextrane natif T 40, et des dextrans modifiés de type CMB, d'autre part, ceux d'un polysaccharide sulfaté : l'héparine, et enfin, ceux de dérivés du type DCMBS portant moins de 15% d'unités saccharidiques substituées par des groupes sulfonate.

A) Protocole pour l'étude de la synthèse de l'ADN:

L'étude de la synthèse de l'ADN est réalisée à l'aide d'un composé radio-marqué : la thymidine tritiée. Pour cela, un protocole adapté aux chondrocytes normaux et tumoraux a été mis au point.

Les tests sont réalisés dans des boîtes de culture de 96 puits. Les cellules sontensemencées en présence de 10% SVF (Sérum de Veau Foetal) à une concentration de 20 000 cellules/ml ; 200 µl de cette suspension cellulaire sont distribués dans les puits. Après une période de 7 à 10 jours, lorsque les cellules sont à confluence, elles sont progressivement privées de sérum

2075291

9

(de façon à arriver à une concentration de sérum dans le milieu de 0,1%). Les substances à tester sont ajoutées dans les puits, à des concentrations variées ainsi que la thymidine tritiée (1 μ Ci/puits). L'incorporation se déroule pendant 48 heures. Pour chaque dose testée, 8 à 10 puits sont étudiés. A la fin de l'incorporation, la couche cellulaire est lavée avec une solution de tampon phosphate (PBS) puis fixée deux fois pendant 5 minutes en présence de méthanol 5%, lavée 4 fois avec 200 μ l de PBS, puis précipitée en présence d'acide trichloracétique (TCA) 5% deux fois pendant 10 minutes à 4°C. Après un dernier lavage, la couche cellulaire est dissoute par 200 μ l d'une solution de NaOH 0,3 M. Les 200 μ l sont prélevés, transférés dans un tube à scintillation, additionnés de 5 ml de liquide scintillant. La radioactivité des tubes est déterminée dans un compteur à scintillation.

B) Etude des effets des différents dérivés de polysaccharides sur la croissance des cellules.

Ces effets ont été étudiés parallèlement, à deux concentrations de sérum de veau foetal, respectivement de 0,5% et de 5%.

1) Dérivés ne portant pas de fonctions sulfate libres :

EXEMPLE 1 (Exemple de comparaison) : effets du dextrane T 40 (Figure 1)

On observe une inhibition de 10% ($P < 0,05$) de l'incorporation de thymidine tritiée aux fortes concentrations ($> 20 \mu\text{g/ml}$) en présence de faibles concentrations de SVF (0,5%) (○).

EXEMPLE 2 (exemple de comparaison) : effets du dextrane substitué $\text{D}_0\text{CM}_{84}\text{B}_{21}\text{S}_0$ (●) (Figure 2)

On observe, en présence de 5% SVF, une stimulation de l'incorporation d'environ 10% ($P < 0,05$) pour des concentrations de 20 et 200 ng/ml, et de 25% ($P < 0,01$)

2075291

10

pour 2 $\mu\text{g/ml}$ de $\text{D}_0\text{CM}_{84}\text{B}_{21}\text{S}_0$. Pour les concentrations plus élevées, l'incorporation n'est pas modifiée.

En présence de faibles concentrations de sérum (0,5%) (\bigcirc), on observe une stimulation d'environ 10% (P<0,05), pour les concentrations de $\text{D}_0\text{CM}_{84}\text{B}_{21}\text{S}_0$ supérieures ou égales à 20 ng/ml.

2) Dérivés portant des fonctions sulfate et sulfamate libres :

EXEMPLE 3 (exemple de comparaison) : Effets de l'héparine

La Figure 3 représente l'effet de l'héparine H 108 (fournie par l'Institut CHOAY) au niveau des chondrocytes tumoraux (type II). On observe peu de modifications de l'incorporation en présence d'héparine quelles que soient les concentrations testées. Seules les concentrations élevées (100 à 400 $\mu\text{g/ml}$) diminuent l'incorporation d'environ 10% (P<0,02) en présence de 5% (\bullet) de SVF.

3) Dérivés de dextrane portant des fonctions sulfonate

EXEMPLE 4 (exemple de comparaison) : effets du dextrane substitué $\text{D}_6\text{CM}_{76}\text{B}_0\text{S}_{14}$ (Figure 4)

En présence de 5% (\bullet) de SVF, on observe une stimulation de 15% (P<0,01) de l'incorporation pour une concentration de dextrane substitué égale à 2 $\mu\text{g/ml}$. Au delà, et pour une concentration de dextrane substitué de 100 à 200 $\mu\text{g/ml}$, on observe 60% (P<0,001) d'inhibition, le maximum étant de 75% (P<0,001) en présence d'une concentration de dextrane substitué de 400 $\mu\text{g/ml}$.

En présence de 0,5% de SVF (\bigcirc), on observe d'abord une activation, puis une légère inhibition de l'ordre de 15% (P<0,05) en présence de 2 $\mu\text{g/ml}$ du dérivé testé. Cette inhibition est de 30% (P<0,001) pour 20 $\mu\text{g/ml}$ et de 53% (P<0,001) pour 100 et 200 $\mu\text{g/ml}$.

EXEMPLE 5 : effets du dextrane substitué conforme à l'invention, $D_{11}CM_{60}B_0S_{29}$ (Figure 5)

En présence de 5% de SVF (●), on observe une légère stimulation (10%) ($P < 0,10$) (N.S.) de l'incorporation pour une concentration de 2 $\mu\text{g/ml}$ de dextrane substitué, puis une inhibition. A 100 $\mu\text{g/ml}$ l'inhibition est de 20% ($P < 0,01$) ; à 200 $\mu\text{g/ml}$, elle est de 60% ($P < 0,001$), et de 75% ($P < 0,001$) pour 400 $\mu\text{g/ml}$.

En présence de 0,5% (○) de sérum, on n'observe, jusqu'à une concentration de 2 $\mu\text{g/ml}$ aucune modification de la croissance ; en revanche, on observe une inhibition de 50% ($P < 0,001$) en présence de 20 $\mu\text{g/ml}$ du dérivé testé ; cette inhibition reste quasiment constante aux plus fortes concentrations testées.

CONCLUSION

L'héparine et le dextrane natif T 40 n'induisent presque aucune modification de l'incorporation de la thymidine au niveau des "chondrocytes" tumoraux, quelles que soient les concentrations de ces dérivés utilisées.

En présence d'une concentration de 2 $\mu\text{g/ml}$ de $D_0CM_{84}B_{21}S_0$ on enregistre une stimulation de 25% de la synthèse d'ADN.

En présence de dérivés substitués de type DCMBS, et en présence de 5% SVF, on observe toujours une légère stimulation de l'incorporation de thymidine pour une concentration de 2 $\mu\text{g/ml}$. Cette stimulation est de 15% pour le $D_6CM_{76}B_0S_{14}$, alors qu'elle n'est que de 10%, à la limite du significatif, pour le dérivé $D_{11}CM_{60}B_0S_{29}$. Pour des concentrations supérieures ou égales à 20 $\mu\text{g/ml}$ c'est une inhibition hautement significative ($P < 0,001$) qui est observée dont le maximum est de 75%, dans le cas du $D_{11}CM_{60}B_0S_{29}$.

En présence de 0,5% de SVF, les effets du $D_{11}CM_{60}B_0S_{29}$ et du $D_6CM_{76}B_0S_{14}$ sont très différents. En

2075291

12

effet, à faibles concentrations de $D_6CM_{76}B_0S_{14}$, on observe une activation de la prolifération cellulaire. Cette activation n'est pas du tout observée, à ces mêmes faibles concentrations, dans le cas de $D_{11}CM_{60}B_0S_{29}$. En outre, l'inhibition observée pour des concentrations de 20 $\mu\text{g/ml}$ est plus importante dans le cas du $D_{11}CM_{60}B_0S_{29}$.

5
10
15
20
25
30
35

III - ETUDE DES EFFETS DES AGENTS ANTITUMORAUX CONFORMES A L'INVENTION SUR LA CROISSANCE DE LIGNEES CELLULAIRES NON TUMORALES D'ORIGINE HUMAINE (CHONDROCYTES ET FIBROBLASTES DE PEAU).

EXEMPLE 6 : effets des agents antitumoraux conformes à l'invention sur les chondrocytes normaux

Le dérivé $D_{11}CM_{60}B_0S_{29}$, conforme à l'invention, a été testé sur des chondrocytes issus de tête fémorale humaine normale, en parallèle avec le dérivé $D_6CM_{76}B_0S_{14}$. Les résultats sont identiques pour les deux dérivés étudiés. La Figure 6 représente l'effet du $D_6CM_{76}B_0S_{14}$. Pour des concentrations de 2 $\mu\text{g/ml}$ à 20 $\mu\text{g/ml}$, l'incorporation de thymidine tritiée est peu modifiée. Pour des concentrations de 100 $\mu\text{g/ml}$, l'inhibition de l'incorporation est de 36% ($P < 0,001$) en présence de 5% de SVF et atteint la valeur de 51% ($P < 0,001$) pour les concentrations de 200 et 400 $\mu\text{g/ml}$. Pour 0,5% de SVF (\bigcirc), les taux d'inhibition sont de l'ordre de 25% ($P < 0,01$).

EXEMPLE 7 : effets des agents antitumoraux conformes à l'invention sur les fibroblastes de peau.

Les effets des dérivés $D_{11}CM_{60}B_0S_{29}$ et $D_6CM_{76}B_0S_{14}$ ont été étudiés sur les fibroblastes de peau.

30
35

La Figure 7 représente l'effet du $D_6CM_{76}B_0S_{14}$. Comme dans le cas des chondrocytes normaux, les effets sont identiques pour les 2 dérivés ; l'incorporation de thymidine tritiée est peu modifiée pour des concentrations de dérivés allant de 2 à 20 $\mu\text{g/ml}$, et ce, en présence des deux concentrations de sé-

2075291

13

rum testées 5% (●) et 0,5% (○). Pour les fortes concentrations des deux dérivés (100 à 400 µg/ml), le taux d'inhibition est d'environ 50% ($P < 0,001$).

CONCLUSION

5 La sensibilité des lignées humaines normales et tumorales à l'action des agents antitumoraux conformes à l'invention est très différente. Le taux d'inhibition pour les lignées normales de chondrocytes et de fibro-
10 blastes est au maximum de 50%, et ce, pour des concentrations très élevées de dérivés conformes à l'invention, alors que l'inhibition maximale pour les chondrocytes tumoraux est de 75%, pour des concentrations beaucoup plus faibles.

15 IV - MODULATION DE LA PROLIFERATION DES CELLULES TUMORALES EN PRESENCE DES DERIVES CONFORMES A L'INVENTION

EXEMPLE 8 : Des cellules de chondrosarcome humain de type II sontensemencées sur des boîtes de 4 cupules de 2 cm² en présence de 5% SVF (●) d'une part
20 (contrôle), et, en parallèle, en présence de 5% SVF (□) et de D₁₁CM₆₀B₀S₂₉ à une concentration de 200 µg/ml. Le milieu est changé tous les 3 jours. Comme le montre la Figure 8, en présence de D₁₁CM₆₀B₀S₂₉ les cellules restent quiescentes; par contre lorsque le D₁₁CM₆₀B₀S₂₉ est
25 ôté du milieu de culture au bout de 12 jours (○), la croissance cellulaire reprend, ce qui montre que l'effet du D₁₁CM₆₀B₀S₂₉ est réversible.

CONCLUSION

30 A une concentration de 200 µg/ml de D₁₁CM₆₀B₀S₂₉, pour laquelle on enregistre seulement 75% d'inhibition de l'incorporation de thymidine, la prolifération cellulaire est totalement inhibée. Cette inhibition par le D₁₁CM₆₀B₀S₂₉ n'est pas cytotoxique car parfaitement réversible.

EXEMPLE 9 : Dans le but de mettre en évidence une action inhibitrice des dextrans substitués, les dérivés ont été testés sur le développement d'un chondrosarcome proche du chondrosarcome humain différencié, le chondrosarcome greffable du rat de Laboratoire. Ces expériences ont été faites in-vivo.

Des rats d'environ 3 mois sont greffés avec ce chondrosarcome (un petit fragment de cette tumeur est implanté stérilement sous la peau du flanc de l'animal). Plusieurs séries de 10 animaux ont été utilisées.

La solution de dextrane substitué est alors injectée localement dans la partie périphérique de la tumeur quand celle-ci a atteint un diamètre d'environ 20 mm.

La croissance totale de la tumeur est ralentie par rapport aux témoins en ce sens qu'on observe un développement moins rapide dans la région de la tumeur qui a reçu l'injection de dextrane substitué.

Nous avons alors cherché à visualiser l'effet en ajoutant du charbon micronisé aux solutions de dextrane substitué avant injection dans la partie périphérique du chondrosarcome. Dans ces conditions, on peut facilement repérer la zone de la tumeur qui a reçu l'injection. On observe alors que la zone de la tumeur où la croissance est ralentie correspond à celle qui a reçu l'injection de dextrane substitué.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'Invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente Invention.

REVENDICATIONS

1) Utilisation d'un dérivé de dextrane constitué par une chaîne polysaccharidique substituée par des groupes carboxyméthyle et carboxyméthylbenzylamide sulfonate, lequel dérivé est désigné par la formule générale $D_xCM_yBS_z$ dans laquelle

D représente dextrane,

CM représente carboxyméthyle,

BS représente carboxyméthylbenzylamide sulfonate,

X représente le nombre moyen d'unités saccharidiques non substituées pour 100 unités saccharidiques,

Y représente le nombre moyen de groupes carboxyméthyle pour 100 unités saccharidiques,

Z représente le nombre moyen de groupes carboxyméthylbenzylamide sulfonate pour 100 unités saccharidiques,

et X est inférieur ou égal à 50, Y est compris entre 10 et 90, et Z est compris entre 15 et 35, pour l'obtention d'un composé inhibiteur de la croissance des cellules tumorales.

2) Dérivé de dextrane, de formule $D_xCM_yBS_z$ telle que définie à la revendication 1, dans laquelle X est égal à 11, Y est égal à 60 et Z est égal à 29, pour l'utilisation comme composé inhibiteur de la croissance des cellules tumorales.

3) Dérivé de dextrane, de formule $D_xCM_yBS_z$ telle que définie à la revendication 1, dans laquelle X est égal à 47, Y est égal à 17 et Z est égal à 24, pour l'utilisation comme composé inhibiteur de la croissance des cellules tumorales.

4) Médicament caractérisé en ce qu'il comprend en tant que principe actif un dérivé de dextrane tel que défini dans l'une quelconque des revendications 2 ou 3.

FIGURE 1

1/8

2075291

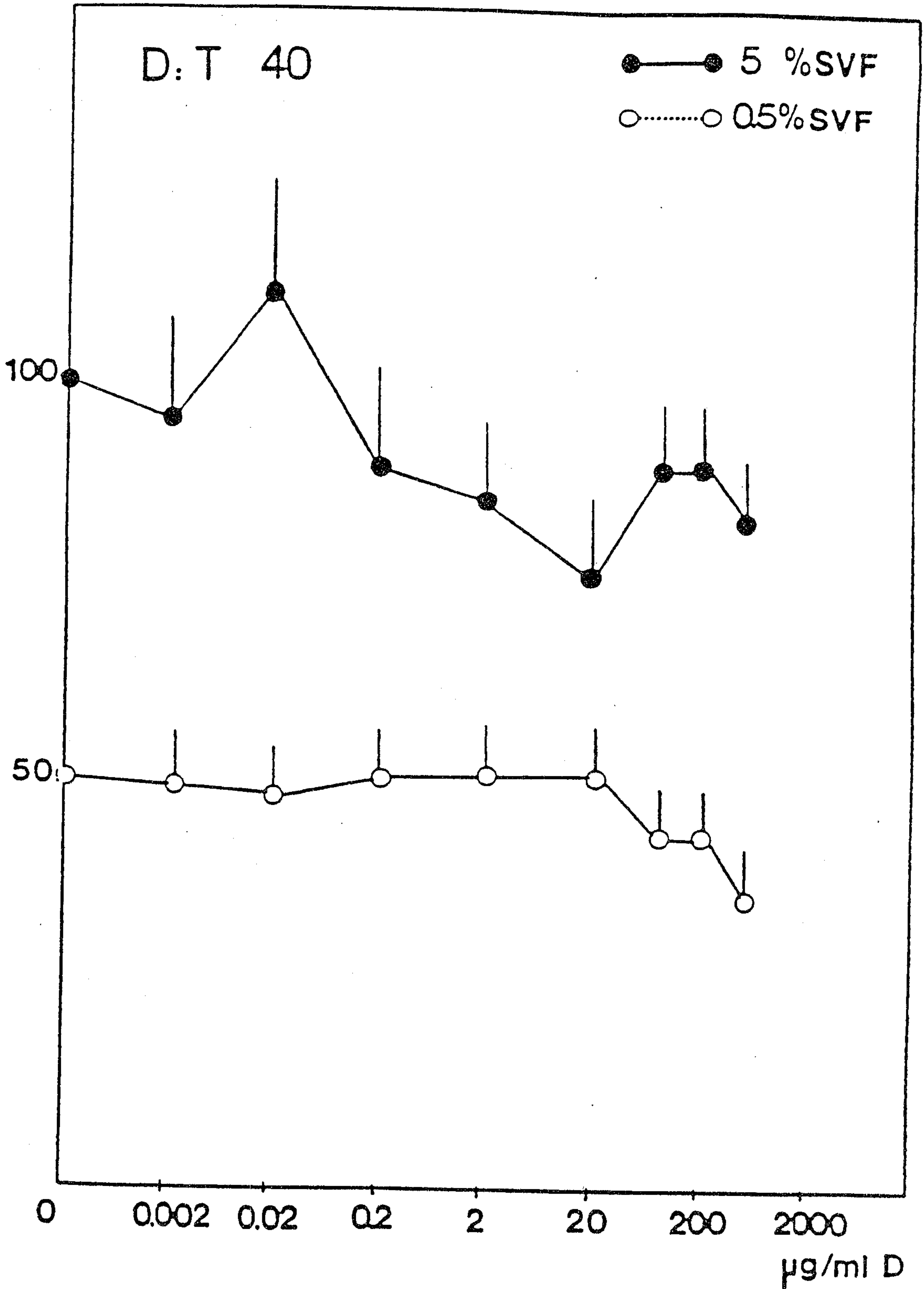


FIGURE 2

2/8

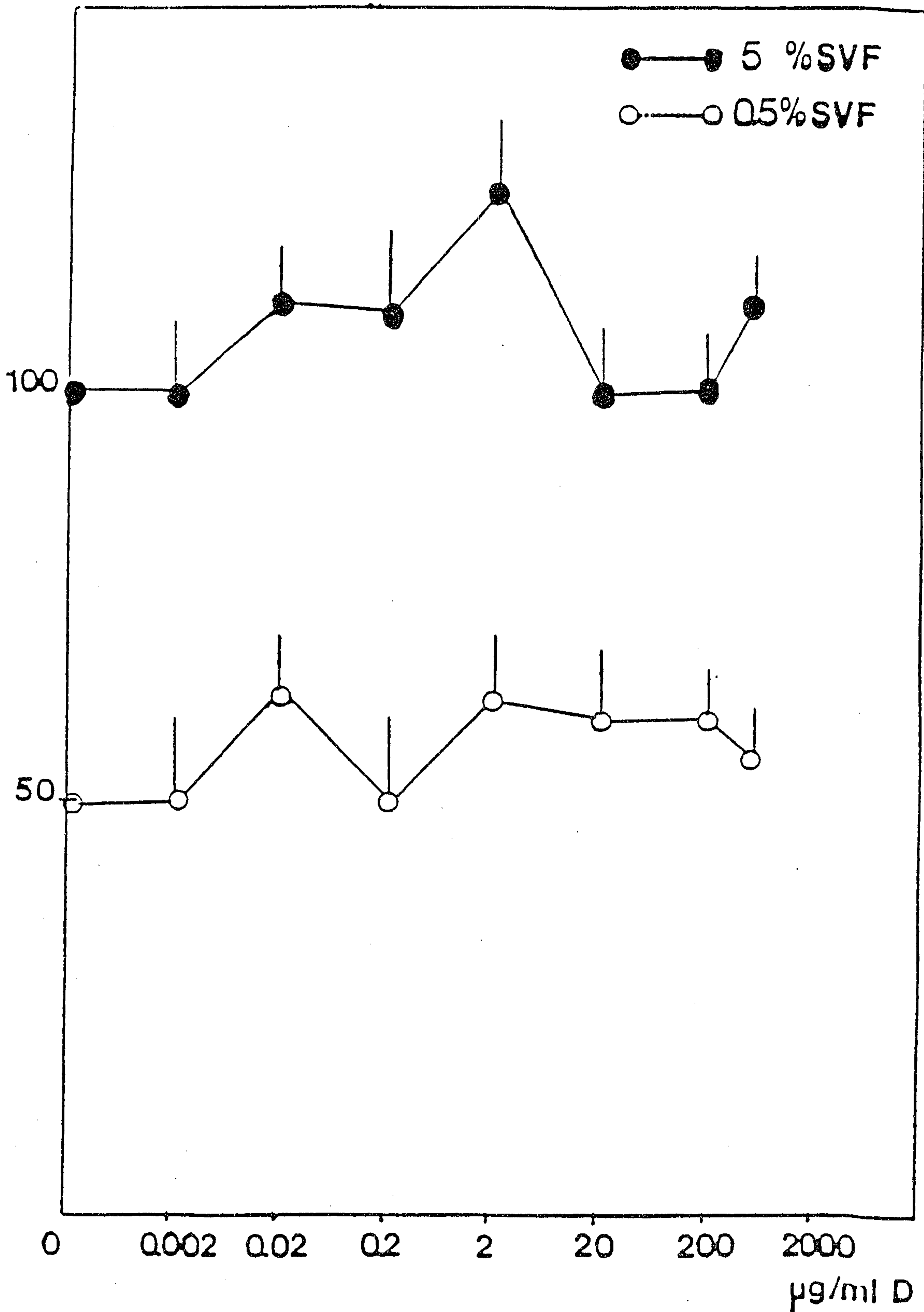


FIGURE 3

2075291

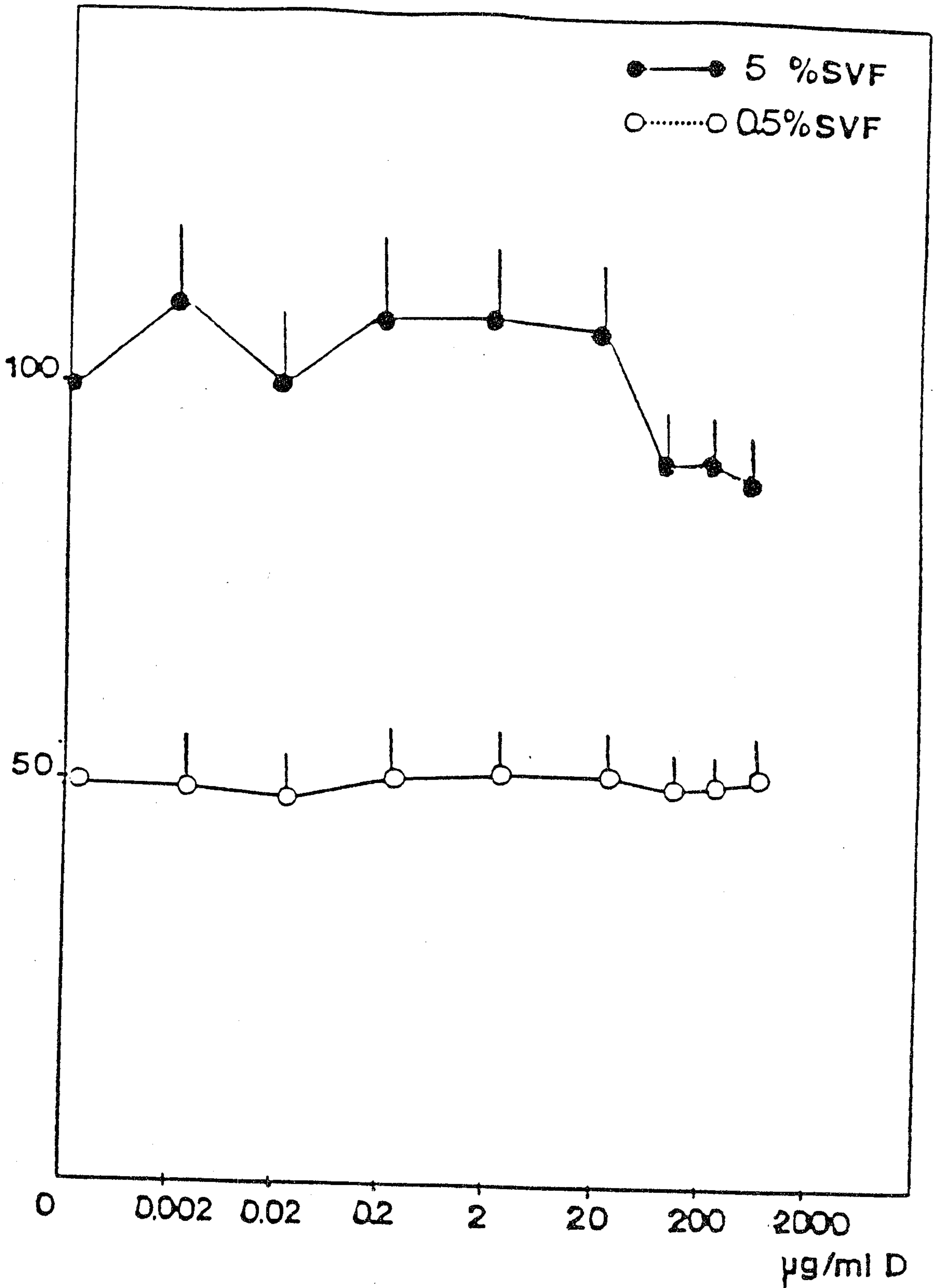


FIGURE 4

4/8

2075291

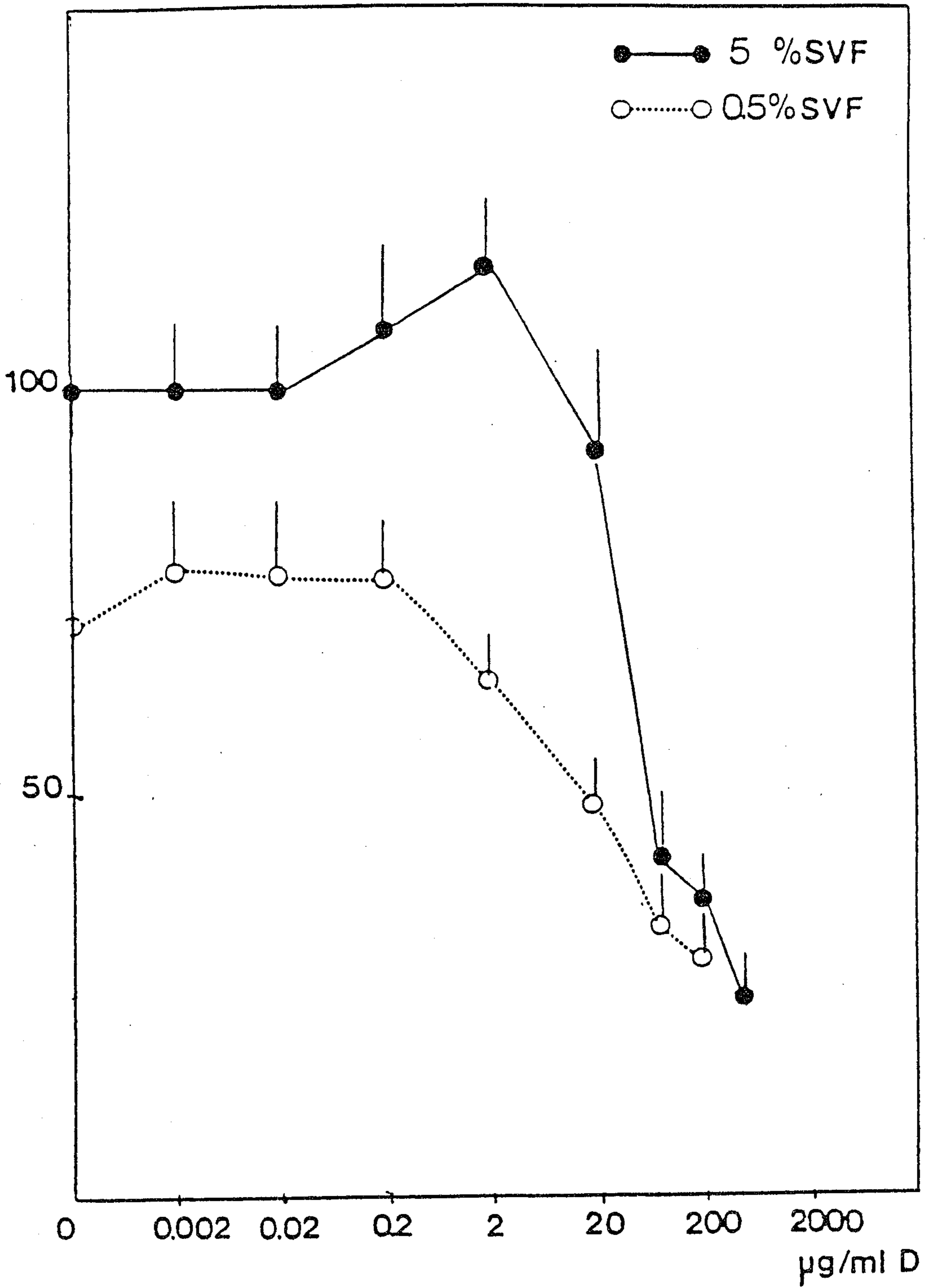
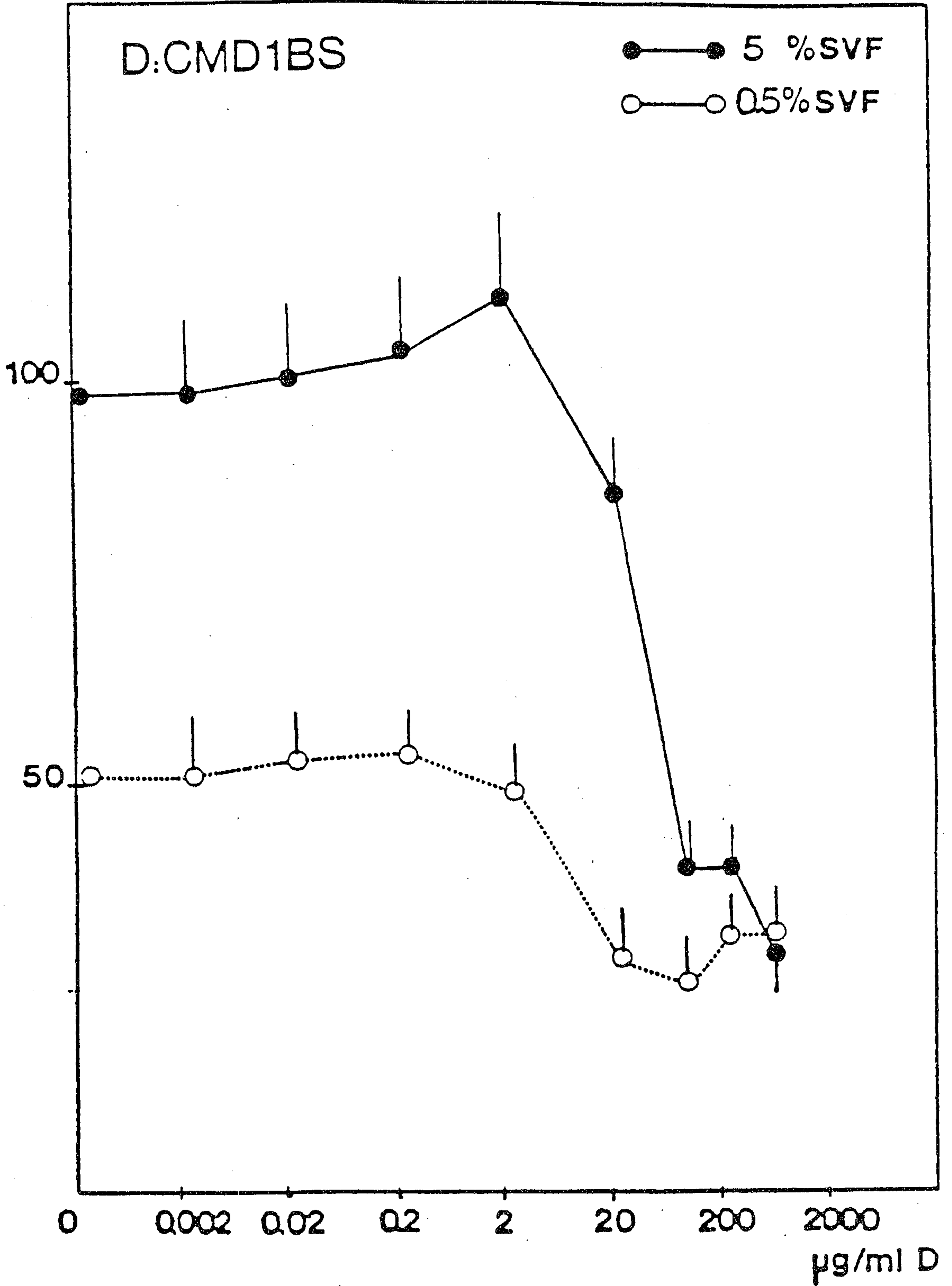


FIGURE 5

2075291
5/8



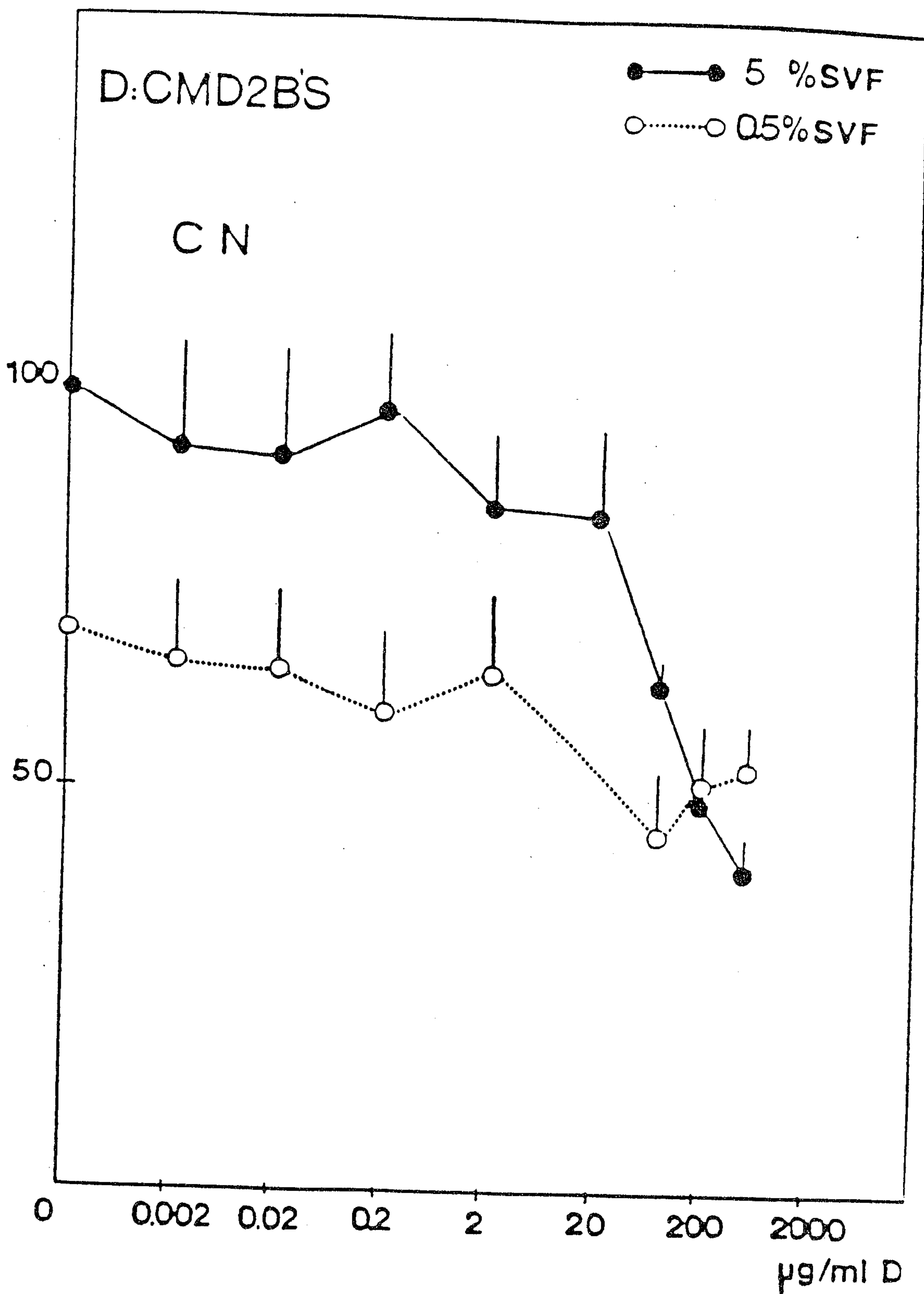


FIGURE 7

7/8

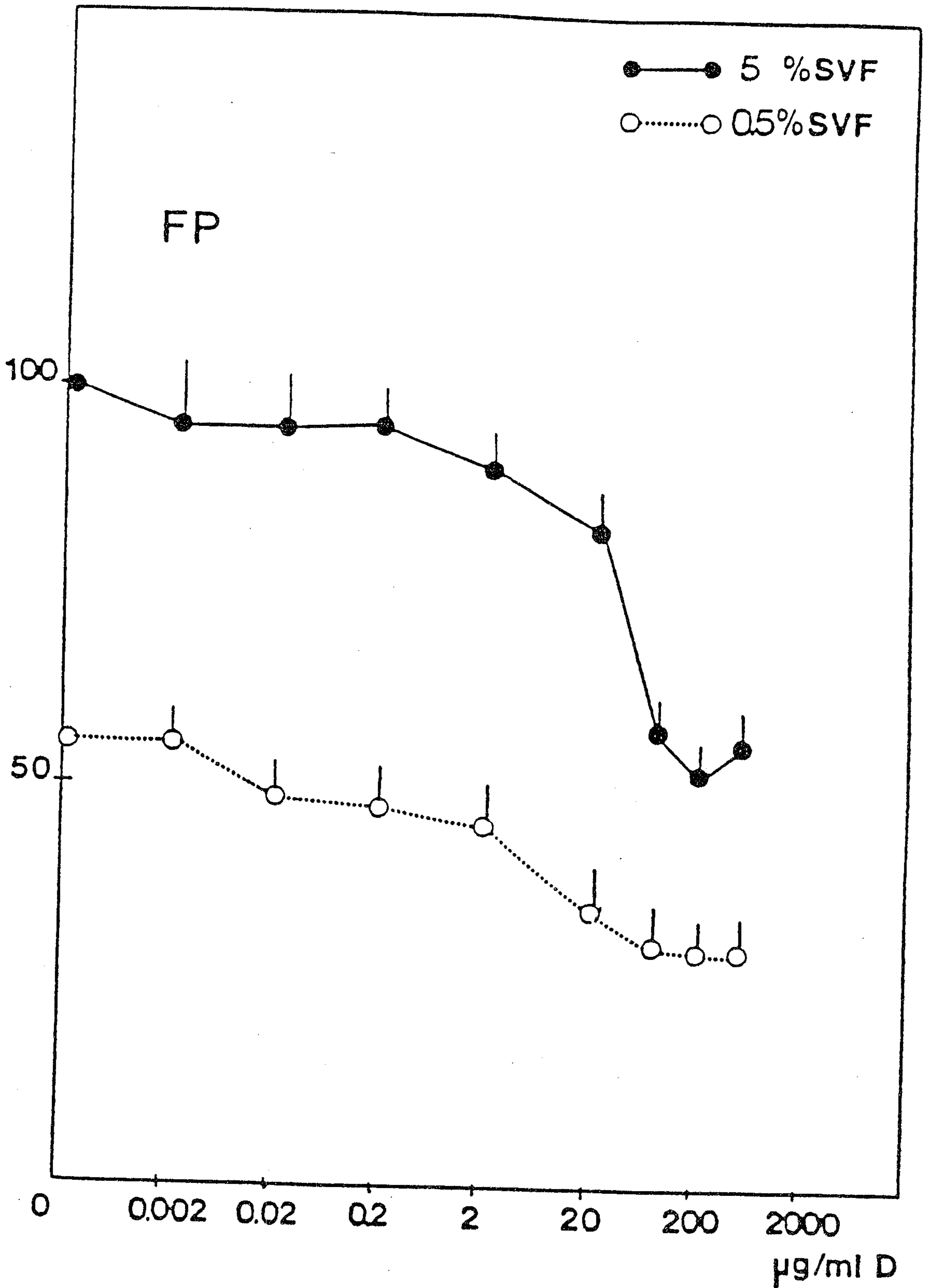


FIGURE 8 2075291
8/8

