

A2

**DEMANDE  
DE CERTIFICAT D'ADDITION**

⑲

**N° 79 24655**

Se référant : au brevet d'invention n° 78 27838 du 28 septembre 1978.

---

⑤4 Nouveaux produits ayant notamment des propriétés anti-cancéreuses à base de chaîne A de la ricine et d'une protéine.

⑤1 Classification internationale (Int. Cl. 3). A 61 K 39/395.

⑲ Date de dépôt..... 3 octobre 1979.

③③ ③② ③① Priorité revendiquée :

④1 Date de la mise à la disposition du public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 15 du 10-4-1981.

---

⑦1 Déposant : Société anonyme dite : CM INDUSTRIES, résidant en France.

⑦2 Invention de : Guy André Voisin, Franz Klaus Jansen et Pierre Gros.

⑦3 Titulaire : *Idem* ⑦1

⑦4 Mandataire : Cabinet Beau de Loménie,  
55, rue d'Amsterdam, 75008 Paris.

---

Certificat(s) d'addition antérieur(s) :

La présente invention concerne de nouveaux produits ayant notamment des propriétés anticancéreuses.

Dans la demande de brevet d'invention déposée le 28 septembre 1978 sous le n° 78 27838, la demanderesse a décrit des produits anticancéreux constitués par couplage d'un agent cytotoxique :  
5 la chaîne A de la Ricine avec une immunoglobuline spécifique d'antigènes portés par des cellules cancéreuses.

Ces produits désignés par le terme "conjugués" étaient préparés par formation d'un pont disulfure entre le groupe thiol  
10 libre éventuellement activé sous forme de disulfure de la chaîne A de la Ricine et une immunoglobuline dans laquelle on a introduit un ou plusieurs groupes thiol ou un ou plusieurs groupes disulfure activé. La présente addition a pour objet divers perfectionnements apportés à la méthode décrite dans la demande principale ainsi que  
15 la préparation de nouveaux conjugués selon cette méthode.

Le premier perfectionnement concerne la préparation de la chaîne A de la Ricine. La méthode indiquée dans la demande principale conduisait à une solution diluée de chaîne A de Ricine. Il a été trouvé qu'en soumettant cette solution à une étape de concentra-  
20 tion sur support C.M. Sepharose<sup>®</sup> combinant les effets d'échange d'ion et d'affinité, on peut obtenir une solution présentant à la fois une concentration élevée et une très grande pureté. En outre, une telle solution laisse déposer par refroidissement la chaîne A sous forme cristallisée.

La chaîne A ainsi préparée est dépourvue de toxicité non spécifique envers des systèmes cellulaires ou des organismes animaux et est donc utilisable pour la confection de conjugués dont la spécificité est strictement apportée par l'anticorps.

Par ailleurs, la présente demande décrit la préparation  
30 de nouveaux conjugués. Ces nouveaux conjugués sont de différents types :

- conjugué entre la chaîne A de Ricine et l'anticorps anti-DNP obtenu par fixation sur l'anticorps d'un réactif de type disulfure différent de celui utilisé dans la demande principale. Dans  
35 celle-ci, le réactif utilisé était l'acide (pyridyl-2 disulfanyl)-3 propionique alors que dans la présente demande il s'agit de l'acide [(pyridyl-2 disulfanyl)-3 propionylamino]-6 hexanoïque ;

- conjugué entre la chaîne A de Ricine et un fragment F (ab)'<sub>2</sub> d'anticorps. Ces fragments d'anticorps F (ab)'<sub>2</sub> contenant les sites de reconnaissance suffisent pour assurer la spécificité des conjugués ;

5 - conjugué entre la chaîne A de Ricine et une immunoglobuline du type M (IgM) dont la spécificité anticorps est la reconnaissance de la forme allélique 1,2 de l'alloantigène Thy porté notamment par les cellules de certaines lignées lymphoïdes cancéreuses [Nature, 209, n° 5022, 521 (1966)].

10 Les exemples suivants illustrent l'invention.

EXEMPLE 1 :

Concentration de la chaîne A de Ricine.

La chaîne A obtenue en solution diluée selon l'exemple 2 du brevet principal est déposée sur une colonne de chromatographie de diamètre intérieur 16 mm contenant 10 ml de Carboxyméthyl Spharose<sup>®</sup> équilibrée avec le même tampon. Dans ces conditions, la chaîne A se fixe ; elle est ensuite éluée avec le tampon TPE. La récupération est quantitative.

20 Un dépôt de 150 mg de chaîne A permet d'éluer des fractions à la concentration moyenne de 10 mg/ml en chaîne A, représentant au total 90 % de la quantité déposée sur la colonne.

La solution concentrée de chaîne A ainsi obtenue présente une pureté supérieure à celle qui résultait de l'application du protocole décrit dans la demande principale, ainsi que cela sera démontré dans le chapitre "Résultats".

Obtention de cristaux de chaîne A.

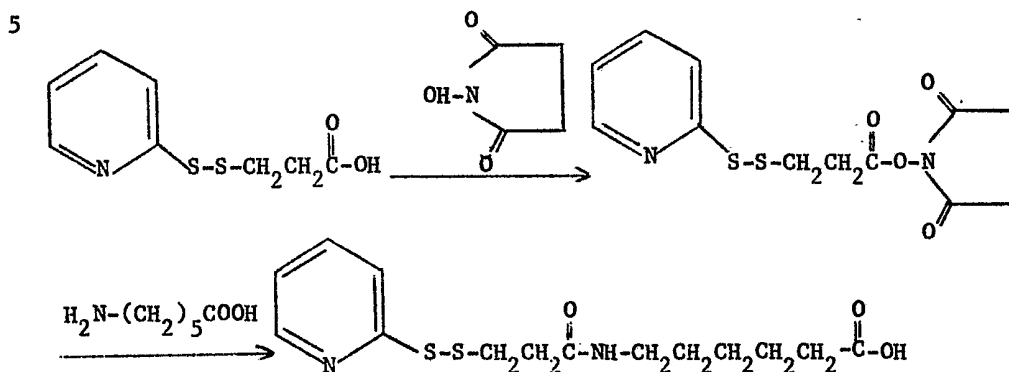
Une solution de chaîne A de concentration égale à 10 mg/ml est abandonnée à 4°C. Il apparaît après quelques jours des cristaux dont l'analyse, après redissolution, révèle qu'ils possèdent les mêmes propriétés physicochimiques (poids moléculaire, point isoélectrique) et biologiques (inhibition de protéosynthèse) que la chaîne A en solution dont ils sont issus.

EXEMPLE 2 :

35 Préparation du conjugué obtenu à partir d'anticorps anti-DNP substitué par un groupe disulfure activé et de chaîne A de Ricine.

a) Acide [(pyridyl-2 disulfanyl)-3 propionyl amino]-6 hexanoïque.

Cet acide s'obtient en 2 étapes à partir de l'acide (pyridyl-2 disulfanyl)-3 propionique sans purification du produit intermédiaire.



- 10 0,430 g de l'acide (pyridyl-2 disulfanyl)-3 propionique obtenu comme décrit dans l'exemple 6 a) de la demande principale est dissous dans 3 ml de pyridine. La solution est refroidie dans un bain de glace. A cette solution, sont ajoutés 0,230 g de N-hydroxy-succinimide en poudre puis 0,453 g de dicyclohexyl carbodiimide
- 15 également en poudre. Le mélange est agité pendant 20 h à 4°C. Le milieu réactionnel est filtré pour éliminer le précipité de dicyclohexylurée formé, le précipité est lavé à la pyridine. La solution de lavage est jointe au filtrat puis la pyridine est évaporée à siccité sous vide poussé. Le résidu obtenu est repris dans l'acétate d'éthyle ;
- 20 un nouveau précipité de dicyclohexylurée se forme ; il est éliminé par filtration. L'acétate d'éthyle est évaporé à siccité sous vide poussé puis l'opération de lavage à l'acétate d'éthyle est reprise deux fois. On obtient ainsi 0,610 g de l'ester attendu.

- 25 Le produit obtenu est dissous en totalité dans 5 ml de tétrahydrofurane. A cette solution, sont ajoutés 0,288 g d'acide amino-6 caproïque en solution dans 2,5 ml d'eau. De la triéthylamine est ajoutée en quantité stœchiométrique par rapport à l'acide amino-6 caproïque (0,222 g) pour maintenir le pH à 7,0. La réaction est poursuivie 20 h à 4°C sous agitation. Le milieu réactionnel est évaporé

à siccité sous vide poussé. Le résidu est repris par 10 ml d'eau. Le milieu est acidifié jusqu'à pH 4,5 par addition d'acide acétique. Il se forme un précipité qui est récupéré par décantation puis solubilisé dans l'acétate d'éthyle. La solution est séchée par le sulfate de magnésium puis filtrée et évaporée à siccité sous vide poussé.

On obtient 0,600 g du produit à purifier. La purification est opérée par chromatographie de partage sur colonne de silice, dans des conditions définies par analyse du produit en chromatographie sur couche mince dans un mélange acétone-chloroforme-acide acétique (15-80-5).

0,410 g du produit obtenu sont déposés sur une colonne de diamètre intérieur 2 cm contenant 160 ml de gel de silice (n° 60, 60-230 mesh MERCK) équilibrée avec le chloroforme. L'élution est opérée en gradient discontinu de méthanol dans le chloroforme ; le produit pur est élué avec le mélange à 2 % de méthanol. Les solvants sont évaporés à siccité sous vide poussé.

Le produit obtenu, jaune pâle et de consistance pâteuse, est caractérisé par son spectre de résonance magnétique nucléaire.

20 b) Préparation d'anticorps anti-DNP activés.

A 9 ml de la solution d'anticorps anti-DNP à la concentration de 11,4 mg/ml dans le tampon TPE, sont ajoutés 9 ml d'un mélange eau/t.butanol 2/1 (v/v) contenant 5,3 mg d'éthyl-1 (diméthylamino-3 propyl)-3 carbodiimide et 13,7 mg d'acide [(pyridyl-2 disulfanyl)-3 propionylamino]-6 hexanoïque. Les opérations sont ensuite menées comme décrit dans l'exemple 6 de la demande principale.

Le dosage des anticorps activés indique un taux moyen de substitution de 0,6 groupement activateur par mole d'anticorps.

La solution d'anticorps ainsi obtenue est concentrée par ultrafiltration jusqu'à 11,1 mg/ml.

30 c) Conjugué

48,8 mg d'anticorps modifiés sont mis en réaction avec 35,6 mg de la chaîne A de Ricine à 7,9 mg/ml dans le tampon TPE. La préparation est menée dans les conditions déjà décrites dans l'exemple 6 de la demande principale. Le taux de couplage moyen

obtenu est de 0,5 chaîne A par mole d'anticorps. La purification du conjugué par filtration est effectuée comme décrit dans l'exemple 6 du brevet principal.

EXEMPLE 3 :

5 Préparation du conjugué obtenu à partir du fragment  $F(ab)'_2$  de l'anticorps anti-DNP et de la chaîne A de Ricine.

a) Préparation du fragment  $F(ab)'_2$  de l'anticorps anti-DNP.

La solution d'anticorps (exemple 4 de la demande principale) est dialysée contre le tampon acétate 120 mM pH 4,7. A 45 ml  
10 de cette solution contenant 500 mg d'anticorps, on ajoute 3 ml d'une solution de pepsine à la concentration de 10 mg/ml dans le même tampon (Pepsine E.C. 3.4.4.1. de porc, 2 fois cristallisée, à 3200 u/mg - SIGMA). L'incubation est maintenue pendant 20 h à 37°C ; l'avancement de l'hydrolyse est vérifié en électrophorèse en présence de dodécyl-  
15 sulfate de sodium [J. Biol. Chem. 244, 4406-4412, (1969)] par disparition de la bande à 150000 dalton correspondant à l'anticorps non hydrolysé.

L'hydrolyse est arrêtée par ajustement du pH du milieu réactionnel à 7,0 à l'aide d'une solution de soude 1 N puis la solution est centrifugée et l'insoluble éliminé. Le surnageant de centrifugation est déposé sur une colonne de diamètre intérieur 50 mm contenant 1800 ml de Sephadex G 150<sup>(R)</sup> équilibrée avec le tampon phosphate 100 mM pH 7,0.

L'élution est effectuée avec le même tampon : le premier  
25 pic obtenu est recueilli en deux fractions ; la première (200 ml) renferme 70 mg de fragment  $F(ab)'_2$  de l'anticorps, la deuxième (100 ml) renferme 70 mg d'un mélange de fragment  $F(ab)'_2$  et d'un fragment contaminant de poids moléculaire 50000 dalton. Le deuxième pic contient des fragments protéiques de poids moléculaire moyen 10000 dalton ;  
30 il est écarté.

Le fragment  $F(ab)'_2$  obtenu pur dans la première fraction du premier pic est concentré par ultrafiltration (protocole décrit dans l'exemple 1 de la demande principale) jusqu'à la concentration de 16 mg/ml et conservé à - 20°C.

35 Le fragment  $F(ab)'_2$  ainsi obtenu présente les caractéristiques suivantes :

. Poids moléculaire : 95000 dalton (déterminé après étalonnage du gel Sephadex G 150<sup>R</sup> ).

. Poids isoélectrique : compris entre pH 7,7 et 8,8 (obtenu par isoélectrofocalisation sur plaque LKB).

5 b) Préparation du fragment F(ab)'<sub>2</sub> activé.

A 15 ml de la solution F(ab)'<sub>2</sub> à la concentration de 15,6 mg/ml sont ajoutés 15,3 ml d'un mélange eau/t.butanol 2/1 (v/v) contenant 17,3 mg d'éthyl-1 (diméthylamino-3 propyl)-3 carbodiimide et 50,4 mg d'acide (pyridyl-2 disulfanyl)-3 propionique. Le mélange est incubé pendant 20 h à 30°C. La solution est ensuite dialysée en continu contre le tampon TPE à 4°C pendant 23 h à un débit de 500 ml/h. Le dosage spectrophotométrique à 343 nm de la pyridine thione-2 libérée par échange avec le glutathion réduit montre que l'activation du fragment F(ab)'<sub>2</sub> a conduit au taux moyen de substitution de 1,5 groupements activateurs par mole de F(ab)'<sub>2</sub>.

La solution de F(ab)'<sub>2</sub> activé ainsi obtenue est concentrée par ultrafiltration jusqu'à 10 mg/ml.

c) Conjugué.

A 13,8 ml de la solution à 10 mg/ml en F(ab)'<sub>2</sub> activé obtenue comme décrit ci-dessus, sont ajoutés 13,8 ml de solution de chaîne A de Ricine à 8 mg/ml dans le tampon TPE.

Le mélange est incubé à température ambiante pendant 24 h sous atmosphère d'azote et à l'abri de la lumière. La solution est ensuite centrifugée à 27000 x g, à 4°C pendant 10 min et le surnageant récupéré. Le dosage de la pyridine thione-2 libérée au cours de la réaction indique que le taux moyen de couplage est de 1,2 équivalent de chaîne A par mole de F(ab)'<sub>2</sub>.

La solution est déposée sur une colonne de diamètre intérieur 50 mm contenant 1730 ml de Sephadex G 200<sup>(R)</sup>. L'élution est effectuée avec le tampon TPE. Les fractions sont recueillies sous un volume de 8,4 ml et l'analyse des fractions est effectuée comme décrit dans les exemples 5 et 6 de la demande principale. Le produit de conjugaison sort en un pic.

Les fractions composant le pic du conjugué sont regroupées en trois solutions qui sont respectivement :

- Solution f : front du pic ;
- Solution g : partie centrale du pic ;
- Solution h : queue du pic.

L'analyse de la solution g par le dosage de son activité inhibitrice de la protéosynthèse (test 1) et le dosage des protéines donne les résultats suivants :

	$\mu\text{g}$ de chaîne A couplée à $\text{F(ab)'}_2$ par ml de solution	Equivalent de chaîne A par mole de $\text{F(ab)'}_2$
Solution g	148	1,4

d) Concentration du conjugué.

En une première étape, la concentration est effectuée par ultrafiltration : 255 ml de la solution g du conjugué (à 148  $\mu\text{g/ml}$  en chaîne A) sont ainsi concentrés jusqu'à 381  $\mu\text{g/ml}$ . La solution est ensuite diluée 10 fois dans l'eau distillée afin d'abaisser la force ionique du milieu.

La solution obtenue (400 ml à 38  $\mu\text{g/ml}$  en chaîne A) est déposée sur une colonne de diamètre intérieur 9 mm contenant 5,7 ml de C. M. Sepharose<sup>(R)</sup> équilibrée avec le tampon phosphate 10 mM pH 6,5 additionné de sel disodique de l'acide éthylènediaminotétracétique 1 mM.

Le dépôt est effectué au débit de 80 ml/h. Dans ces conditions, la totalité du conjugué se fixe sur la colonne. A la fin du dépôt, on laisse passer 4,5 ml du même tampon puis l'élution du conjugué est réalisée avec le tampon TPE, au même débit.

Le conjugué sort en un seul pic. La queue du pic, contenant peu de protéines, est écartée ; les fractions restantes sont regroupées et la concentration en chaîne A est déterminée.



Le dosage indique que l'opération de concentration sur C.M. Sepharose<sup>®</sup> a permis de porter la concentration de la chaîne A du conjugué à 3,6 mg/ml. L'opération est quantitative et les fractions composant la solution à 3,6 mg/ml représentent au total 76 % de la quantité de conjugué déposé sur la colonne.

EXEMPLE 4 :

Préparation du conjugué obtenu à partir de l'anticorps IgM anti-Thy 1.2 et de la chaîne A de Ricine.

a) Préparation de l'anticorps IgM anti-Thy 1.2.

10 L'IgM pure est préparée à partir du liquide d'ascite obtenu auprès de OIAC LTD (Thy-1.2 F7 D5 monoclonal IgM cytotoxic antibody).

15 A 50 ml de liquide d'ascite contenant l'anticorps sont ajoutés 15 g de sulfate d'ammonium en poudre. Après dissolution, le mélange est incubé pendant 1 h à 4°C puis l'ensemble est centrifugé pendant 20 min à 17000 x g.

20 Le surnageant de centrifugation est écarté. Le culot est dissous dans 20 ml de tampon phosphate 100 mM pH 7,0 puis la solution est dialysée en continu contre 10 l du même tampon. La solution obtenue est déposée sur une colonne de diamètre intérieur 50 mm contenant 1800 ml de Sepharose 6B<sup>®</sup> équilibrée avec le tampon phosphate 100 mM pH 7,0. L'élution est effectuée avec le même tampon : le premier pic obtenu correspond à des agrégats d'IgM. Le deuxième pic obtenu est recueilli en deux fractions : la première fraction (du front jusqu'au sommet du pic) est composée d'IgM pure ; la deuxième fraction renferme un mélange de l'IgM et d'une protéine contaminante de poids moléculaire évalué à environ 660000 dalton. Cette deuxième fraction est traitée à nouveau par le sulfate d'ammonium et le précipité obtenu est centrifugé puis redissous dans le tampon phosphate 100 mM pH 7,0. La solution obtenue est déposée sur la colonne de Sepharose 6B<sup>®</sup> convenablement lavée après la première opération. L'élution par le tampon phosphate 100 mM pH 7,0 donne lieu, comme lors de la première opération, à l'apparition de deux pics. Le deuxième pic obtenu contient l'IgM pure. Chacune des deux opérations de filtration sur Sepharose 6B<sup>®</sup> a ainsi permis d'obtenir une fraction renfermant l'IgM pure. Ces deux fractions sont réunies puis l'ensemble

est traité par le sulfate d'ammonium à la concentration finale de 300 mg/ml, à 4°C ; la préparation est centrifugée pendant 20 min à 17000 x g puis le culot est repris dans le tampon phosphate 100 mM pH 7,4 additionné de chlorure de sodium 400 mM.

5 L'ensemble des opérations permet de préparer 8 ml d'une solution à 6,4 mg/ml d'IgM pure. L'analyse en électrophorèse en présence de dodécylsulfate de sodium a été utilisée pour caractériser les fractions ; l'IgM pure ainsi obtenue présente à l'analyse 2 bandes très proches, d'intensités égales, correspondant aux poids moléculaires  
10 très voisins de 900000 dalton.

b) Préparation de l'anticorps anti-Thy 1.2 activé.

A 7,6 ml de la solution d'IgM à la concentration de 7,0 mg/ml sont ajoutés 0,46 ml d'un mélange eau/t.butanol 1/5 (v/v) contenant 2,9 mg d'éthyl-1(diméthylamino-3 propyl)-3 carbodiimide et  
15 7,7 mg d'acide (pyridyl-2 disulfanyl)-3 propionique. Le mélange est incubé pendant 20 h à 30°C. La solution est ensuite dialysée en continu contre le tampon phosphate 100 mM pH 7,4 additionné de chlorure de sodium 400 mM et du sel disodique de l'acide éthylènediaminotétracétique 1 mM. La dialyse est poursuivie pendant 23 h à 4°C à un débit  
20 de 500 ml/h. La solution est ensuite centrifugée à 27000 x g à 4°C pendant 10 min et le surnageant récupéré. Le dosage spectrophotométrique à 343 nm de la pyridine thione-2 libérée par échange avec le glutathion réduit montre que l'activation de l'anticorps a conduit  
25 au taux moyen de substitution de 13 groupements activateurs par mole d'IgM.

c) Conjugué.

La solution de chaîne A obtenue, comme décrit dans l'exemple 1, est dialysée en continu contre le tampon phosphate 100 mM pH 7,4 additionné de chlorure de sodium 400 mM et de sel diso-  
30 dique de l'acide éthylènediaminotétracétique 1 mM ; la dialyse est menée à un débit de 500 ml/h pendant 20 h à 4°C.

A 6,8 ml de la solution d'IgM activée obtenue comme décrit ci-dessus, sont ajoutés 3,9 ml de chaîne A dialysée, à la concentra-  
35 tion de 7,4 mg/ml. Le mélange est incubé pendant 24 h à température ambiante, sous atmosphère d'azote et à l'abri de la lumière. Le dosage de la pyridine thione-2 libérée au cours de la réaction indique que

le taux moyen de couplage est de 9,7 équivalents de chaîne A par mole d'IgM.

La solution est déposée sur une colonne de diamètre intérieur 50 mm contenant 1727 ml de Sepharose 6B<sup>®</sup> équilibrée avec le tampon de conjugaison. L'élu-tion est menée avec le même tampon. Les fractions sont recueillies sous un volume de 3,7 ml et l'analyse des fractions est effectuée comme décrit dans les exemples 5 et 6 de la demande principale. Le produit de conjugaison sort en deux pics : le premier correspond au conjugué de poids moléculaire moyen supérieur à celui de l'IgM ; le second pic correspond au conjugué de poids moléculaire moyen approximativement équivalent à celui de l'IgM. La partie centrale de ce pic (solution i) est retenue.

La composition du conjugué de la solution i correspond aux caractéristiques suivantes :

	ug de chaîne A couplée à l'IgM par ml de solution	Equivalents de chaîne A par mole d'IgM
Solution i	23,7	3,2

Les conjugués selon l'invention ainsi que les composés utilisés dans l'élaboration desdits conjugués ont été étudiés en ce qui concerne leurs propriétés biologiques et particulièrement leur action anticancéreuse.

Les différents tests utilisés sont indiqués ci-après.

TESTS IN VITRO :

1 - Inhibition de la protéosynthèse en modèle acellulaire :

Test décrit dans la demande principale.

2 - Inhibition de la protéosynthèse en modèle cellulaire :

Dans le cas de conjugué à spécificité anti-DNP, ce test a été décrit dans la demande principale.

Pour le conjugué à spécificité anti-Thy 1.2., les cellules utilisées sont de la lignée WEHI-7 (lymphome de souris Balb/C) obtenue auprès du SALK INSTITUTE - SAN DIEGO (Californie). Ces cellules ne subissent aucune étape de marquage car elles portent naturellement l'antigène Thy 1.2. à leur surface. L'incubation avec le conjugué puis la mesure du taux de protéosynthèse se déroulent comme décrit précédemment.

RESULTATS :

Chaîne A :

La solution concentrée de chaîne A dans le tampon TPE, préparée comme décrit dans l'exemple 1, est soumise au dosage de son activité d'inhibition de protéosynthèse sur système acellulaire (test 1) et sur système cellulaire (test 2).

L'activité de la chaîne A dans le test 1 est identique à celle mesurée sur la préparation de chaîne A décrite dans la demande principale, ce qui indique que la propriété biologique intrinsèque de la chaîne A n'est pas changée par l'étape de concentration sur C.M. Sepharose <sup>®</sup>.

Les résultats des dosages selon le test 2 sont présentés dans le tableau ci-dessous :

	Expression de l'activité	Ricine	Chaîne A	Rapport d'activité Ricine/chaîne A	
25	CI <sub>50</sub> en mole/litre	4.10 <sup>-11</sup>	Chaîne A préparée comme décrit dans la demande principale (rappel)	5.10 <sup>-8</sup>	1250
30			Chaîne A ayant subi la concentration sur C.M. Sepharose	68,6.10 <sup>-8</sup>	17150

Ces résultats indiquent que l'étape de concentration sur C.M. Sepharose permet d'abaisser encore la toxicité non spécifique de la chaîne A par une augmentation notable de la pureté de la préparation. La chaîne A purissime ainsi produite est dépourvue de toxicité non spécifique envers un système cellulaire ; ceci est clairement montré par le rapport d'activité entre la Ricine et la chaîne A dans ce test, qui est supérieur à 10000.

Des essais d'absorption exhaustive de la chaîne A ont été menés en utilisant successivement des excès de cellules Hela et d'hématies mises en contact de la chaîne A et en mesurant la toxicité cellulaire de la chaîne A dans le surnageant d'absorption

5 (test 2) :

- la toxicité cellulaire de la solution de chaîne A préparée, comme décrit dans la demande principale, est abaissée par absorption et ramenée ainsi au niveau de la toxicité de la solution de chaîne A concentrée sur C.M. Sepharose et non absorbée ;

10 - au contraire, la toxicité de la préparation concentrée sur C.M. Sepharose n'est plus diminuée par les essais d'absorption, ce qui confirme l'absence totale d'affinité de la chaîne A ainsi préparée envers les membranes plasmiques des cellules et, par voie de conséquence, le degré extrême de pureté obtenu.

15 Conjugués :

La toxicité spécifique des conjugués a été dosée dans le test 2 et les résultats portés sur les figures 1 et 2.

Ces figures représentent respectivement :

20 - pour la figure 1 l'inhibition de l'incorporation de  $^{14}\text{C}$ -leucine dans les cellules Hela et Hela-TNP ; en ordonnée on a porté l'incorporation de  $^{14}\text{C}$ -leucine en pour cent et en abscisse les concentrations (nM) de chaîne A ; les diverses courbes représentent les résultats obtenus pour :

25 . la Ricine :  $\text{CI}_{50}$  (en chaîne A)  $5,5 \cdot 10^{-11}$  M. (1)

. la chaîne A :  $\text{CI}_{50}$  (en chaîne A)  $9 \cdot 10^{-7}$  M. (2)

. conjugué (solution g) :

. sur Hela :  $\text{CI}_{50}$  (en chaîne A) non déterminable(3)  
(supérieure à  $10^{-5}$  M).

30 . sur Hela-TNP :  $\text{CI}_{50}$  (en chaîne A)  $4,5 \cdot 10^{-9}$  M. (4)

35 - pour la figure 2 l'inhibition de l'incorporation de  $^{14}\text{C}$ -leucine dans les cellules WEHI-7 ; en ordonnée on a porté l'incorporation de  $^{14}\text{C}$ -leucine en pour cent et en abscisse les concentrations (nM) de chaîne A ; les diverses courbes représentent les résultats obtenus pour :

- . la Ricine :  $CI_{50}$  (en chaîne A)  $2,4.10^{-11}$  M. (1)
- . la chaîne A :  $CI_{50}$  (en chaîne A)  $8,1.10^{-7}$  M. (2)
- . IgM pure (les concentrations d'IgM sont reportées  
à la même échelle que les concentrations de chaîne A) :  
non déterminable. (3)
- . Conjugué  
(solution i) :  $CI_{50}$  (en chaîne A)  $5,2.10^{-11}$  M.

5  
10 Le conjugué formé à partir de la chaîne A de Ricine et du fragment  $F(ab)'_2$  d'IgG anti-DNP présente une forte toxicité envers les cellules Hela-TNP (figure 1).

15 Cette toxicité est assortie de la spécificité d'action puisque le rapport des activités envers cellules Hela portant et ne portant pas le TNP est supérieur à 2000. L'utilisation des fragments d'anticorps portant les sites de liaison à l'antigène permet donc d'assurer l'efficacité et la spécificité des conjugués qui en sont  
issus.

20 Le conjugué formé à partir de la chaîne A de Ricine et de l'IgG anti-DNP, en utilisant comme activateur de l'IgG l'acide [(pyridyl-2 disulfanyl)-3 propionylamino]-6 hexanoïque, a une toxicité et une spécificité identiques à celles du conjugué préparé dans l'exemple 6 de la demande principale.

L'établissement du pont disulfure entre l'IgG et la chaîne A par l'intermédiaire de ce type de molécule activatrice aboutit donc à des conjugués efficaces et spécifiques.

25 Le conjugué formé à partir de la chaîne A et de l'IgM anti-Thy 1.2 présente une très haute toxicité envers les cellules cancéreuses portant cet antigène (figure 2). La spécificité d'action est très grande (rapport supérieur à 10000 entre l'activité du conjugué et celle de la chaîne A).

30 Il est ainsi démontré que l'établissement du pont disulfure entre la chaîne A et un anticorps spécifique d'un antigène naturellement porté par des cellules cancéreuses permet la destruction des cellules cancéreuses avec une très grande efficacité et une spécificité d'action importante.

TEST IN VIVO :

Le conjugué préparé dans l'exemple 4 a été testé pour son activité anticancéreuse in vivo.

Les cellules cancéreuses utilisées sont de la lignée WEHI 22.1 (obtenue auprès du SALK INSTITUTE - SAN DIEGO - Californie) provenant d'un lymphome de souris Balb/C. Elles sont injectées à des souris Balb/C obtenues auprès de BOMHOLTGAARD (Danemark) et maintenues depuis leur naissance et pendant la durée du test en zone indemne d'organismes pathogènes spécifiques (SPF).

Dans le test, les cellules WEHI 22.1 maintenues en culture continue sont collectées au troisième jour après repiquage de la culture, lavées par centrifugation et resuspendues dans un tampon phosphate isotonique (PBS) à la concentration de  $12 \cdot 10^6$  cellules/ml.

0,2 ml de la suspension est injecté par voie intrapéritonéale aux souris au préalable réparties au hasard dans leurs cages et repérées individuellement par marquage des pattes.

Chez les souris non traitées par le conjugué, l'injection intrapéritonéale de cellules WEHI 22.1 est suivie du développement de ces cellules en tumeurs dispersées dans le péritoine avec formation d'un ascite. Le développement des cellules s'accompagne d'une augmentation du poids corporel. L'ascite est détecté par l'observation de l'augmentation du volume abdominal.

Une heure après injection des cellules, les animaux traités par le conjugué reçoivent intrapéritonéalement 1 ml de solution du conjugué (solution 1, 23,7  $\mu$ g/ml en chaîne A) préalablement dialysée extensivement contre le tampon PBS puis stérilisée par filtration. Les lots d'animaux témoins reçoivent 1 ml de tampon PBS ne contenant pas de conjugué.

Au septième jour après inoculation des cellules, les animaux traités reçoivent une deuxième injection de conjugué dans les mêmes conditions et les animaux témoins une deuxième injection de tampon PBS.

Les résultats du test apparaissent sur les figures 3 et 4. La figure 3 décrit la chronologie de l'apparition des ascites chez les animaux traités et non traités ; on a porté en ordonnée le pourcentage des animaux présentant un ascite et en abscisse le nombre

de jours après l'inoculation des cellules WEHI 22.1. La courbe en trait plein représente les résultats obtenus sur animaux traités et la courbe en traits discontinus les résultats obtenus sur animaux non traités.

5 La figure 4 montre l'augmentation moyenne de poids (en g) corporel (la ligne de base correspond au poids des animaux avant l'inoculation) en fonction du nombre de jours après l'inoculation des cellules WEHI 22.1. Cette évolution du poids est exprimée par rapport au poids de ces mêmes animaux 3 jours avant l'inoculation  
10 des cellules. La courbe en trait plein correspond aux résultats obtenus sur des animaux traités et la courbe en trait discontinu les résultats obtenus avec des animaux non traités.

L'ajustement linéaire est fait selon la méthode des moindres carrés. L'interprétation des résultats est  
15 donnée dans le tableau suivant :

	Coefficient de corrélation	Pente	Ecart type
Animaux témoins	0,79	0,54	0,04
Animaux traités	0,89	0,64	0,03

20 La figure 3 fait état d'une inhibition de la formation des ascites chez les animaux traités par le conjugué ; cette inhibition se traduit par un décalage dans l'apparition des ascites.

Sur la figure 4, on constate également une inhibition de l'augmentation de poids corporel chez les animaux traités par le  
25 conjugué par rapport aux animaux témoins.

Ces observations sont validées par l'analyse statistique des résultats :

- l'inhibition par le conjugué de la formation des ascites est significative au seuil de confiance de 1 % (test X<sup>2</sup>) ;
- 30 - l'inhibition par le conjugué de l'augmentation pondérale est significative au seuil de confiance 5 % (test de comparaison des pentes des ajustements linéaires).

Le test in vivo permet de démontrer l'activité anti-cancéreuse du conjugué formé à partir de la chaîne A de Ricine et  
35 de l'IgM anti-Thy 1.2. Cette activité est révélée par l'inhibition du développement de cellules cancéreuses WEHI 22.1 injectées à la souris Balb/C.



RE V E N D I C A T I O N S

1 - Procédé de préparation de produits cytotoxiques en provoquant la formation d'une liaison covalente au moyen d'un pont disulfure entre un composé cytotoxique, la chaîne A de la Ricine, et un anticorps, une immunoglobuline ou une fraction d'immunoglobuline spécifique d'un antigène donné, porté par les cellules que l'on veut détruire, caractérisé en ce que l'on purifie la chaîne A de la Ricine par chromatographie jusqu'à l'obtention, après refroidissement, de chaîne A cristallisée.

2 - Produits cytotoxiques nouveaux constitués de composés conjugués dans lesquels la chaîne A de la Ricine est couplée par un pont disulfure à une structure protéinique convenable notamment un anticorps, caractérisés en ce que ledit anticorps est choisi parmi :

- le fragment  $F(ab)'_2$  de l'anticorps anti-DNP ;
- l'IgM anti-Thy 1.2.

1/3

Fig. 1

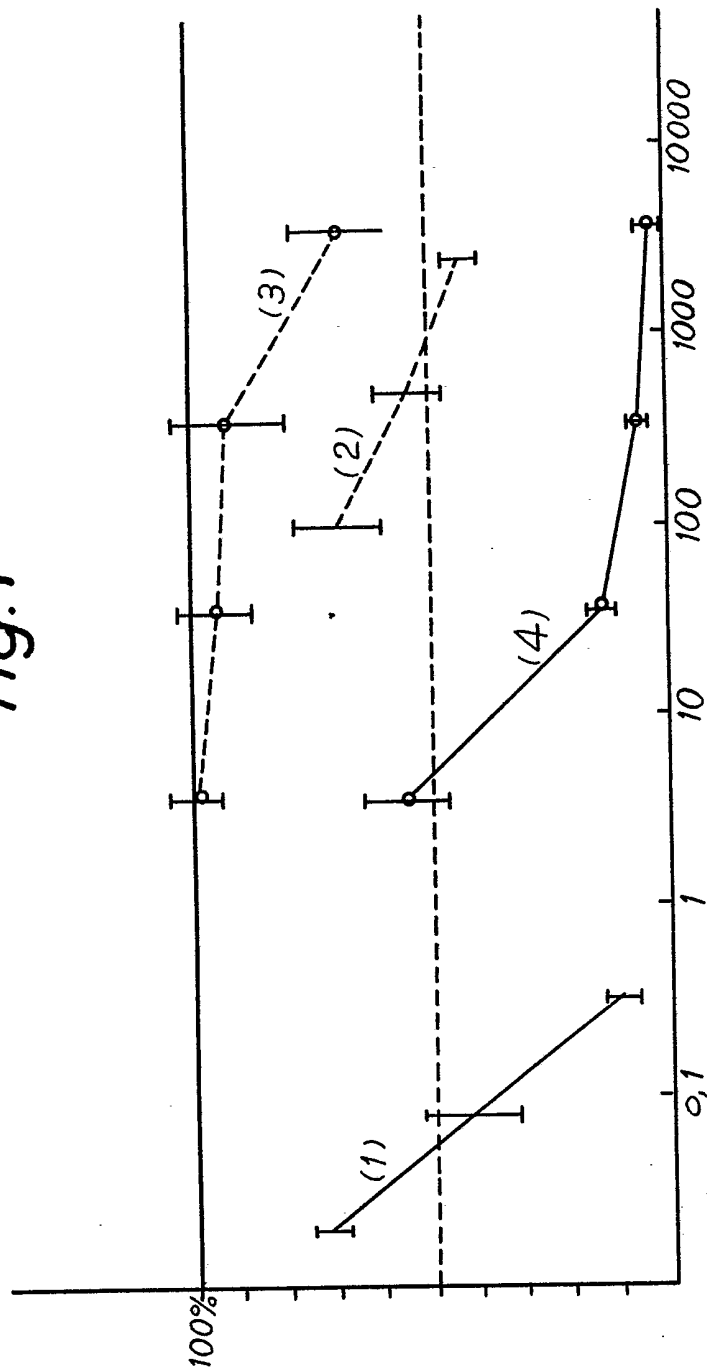


Fig. 2

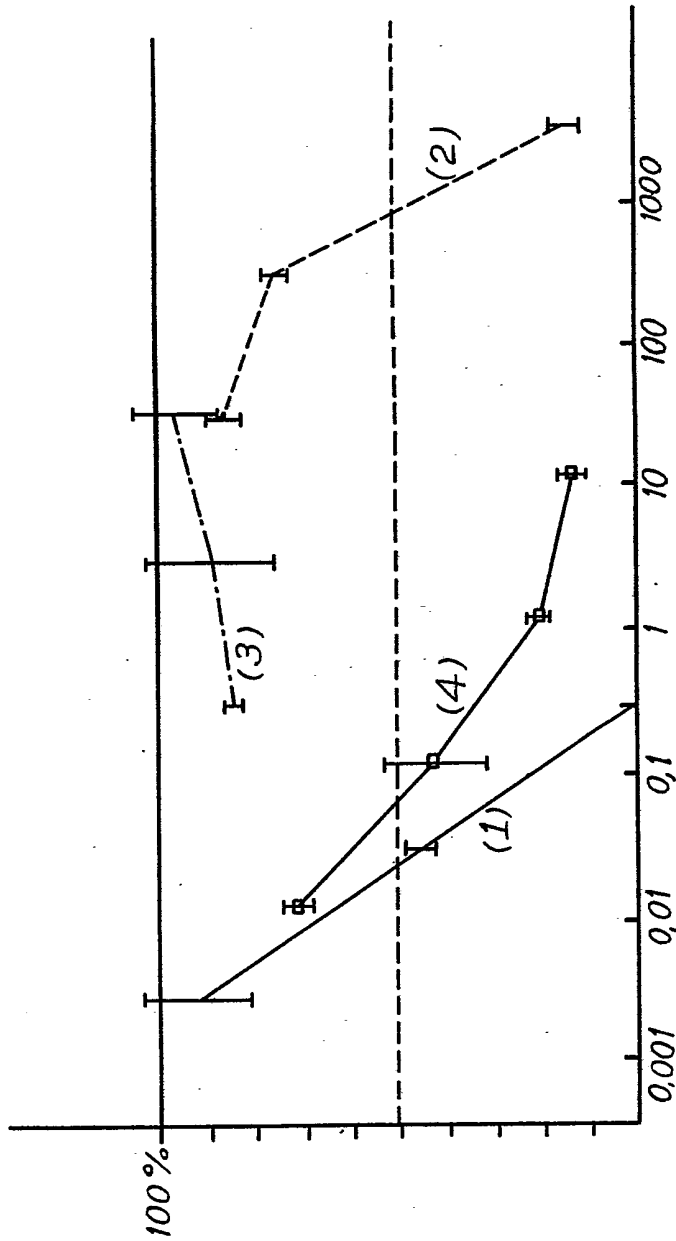


Fig. 3 3/3

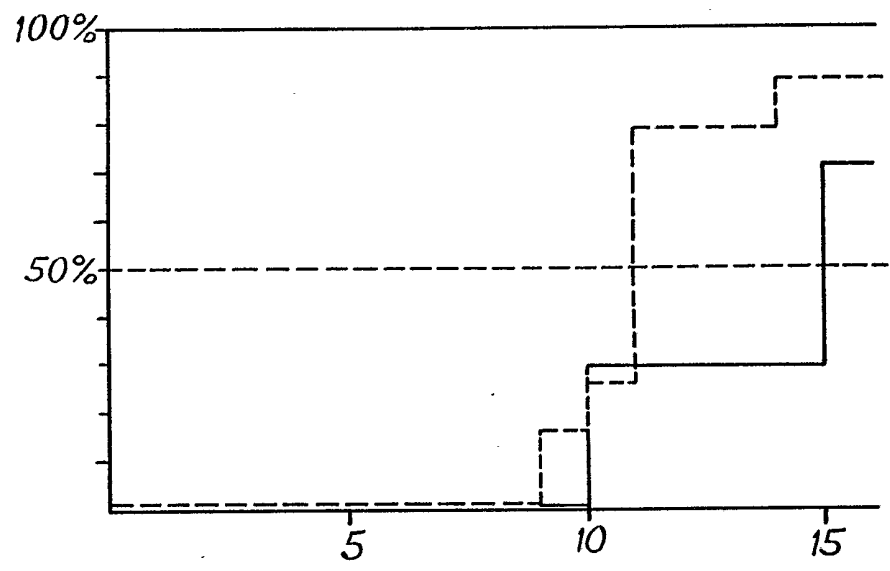


Fig. 4

