



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

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07K 9/00, A61K 47/18</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 96/31533 (43) Date de publication internationale: 10 octobre 1996 (10.10.96)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00527 (22) Date de dépôt international: 5 avril 1996 (05.04.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/04194 7 avril 1995 (07.04.95) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): VACSYN S.A. [FR/FR]; Les Chevrans, 33, boulevard du Général-Martial-Valin, D-75015 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BAHR, Georges [FR/FR]; Minerve 1, 14, rue Paul-Lafargue, F-92800 Puteaux (FR). LEFRANCIER, Pierre [FR/FR]; Chevry 2, 46, allée de la Mare-Loiseau, F-91190 Gif-sur-Yvette (FR). CHEDID, Louis [FR/FR]; 18, rue Gaston-Caillavet, F-75015 Paris (FR). (74) Mandataire: ERNEST GUTMANN - YVES PLASSERAUD S.A.; 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>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></p>	
<p>(54) Title: MDP DERIVATIVES AND CONJUGATES HAVING HAEMATOPOIETIC FUNCTION STIMULATING ACTIVITY, AND COMPOSITIONS CONTAINING SAME</p>		
<p>(54) Titre: DERIVES ET CONJUGUES DU MDP PRESENTANT UNE ACTIVITE STIMULATRICE DE LA FONCTION HEMATOPOIETIQUE ET COMPOSITION LES CONTENANT</p>		
<p>(57) Abstract</p>		
<p>A pharmaceutical composition for stimulating the haematopoietic function and preventing the myelotoxic side-effects of some treatments, containing at least one water-soluble muramyl peptide derivative such as Muradimetide, muroctasine or MTP-PE.</p>		
<p>(57) Abrégé</p>		
<p>Composition pharmaceutique destinée à stimuler la fonction hématopoïétique et prévenir les effets myélotoxiques de certains traitements contenant au moins un dérivé hydrosoluble de muramyl peptide comme par exemple le Muradimétide, la murocstasine ou le MTP-PE.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

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

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

**DERIVES ET CONJUGUES DU MDP PRESENTANT UNE ACTIVITE
STIMULATRICE DE LA FONCTION HEMATOPOIETIQUE ET COMPOSITIONS
LES CONTENANT.**

5 L'invention est relative à une composition pharmaceutique capable de stimuler la fonction hématopoïétique de manière à mobiliser et faire apparaître dans la circulation des taux extrêmement élevés de cellules souches provenant de la moelle osseuse. Cette invention permet de proposer :

- 1) des thérapies antimyélotoxiques nouvelles ;
- 10 2) des procédés nouveaux de récolte de cellules souches de la moelle osseuse permettant de remplacer les biopsies de moelle en vue :
 - a) de greffes autologues ou homologues,
 - b) d'utilisation dans les techniques de thérapie génique.

Ladite composition pharmaceutique comprend au moins un dérivé de
15 MDP de formule générale (I) ci-dessous, et dont un exemple particulièrement performant pour l'objet de l'invention est le Muradimétide de formule Nac-Mur-L-Ala-D-Glu-[OCH₃]-OCH₃ ou MDPA-diméthyl ester.

Les muramyl peptides et leurs dérivés esters sont une famille de
20 molécules qui ont été décrites dans de nombreuses publications et de nombreux brevets depuis la première description du N-Acétyle-Muramyl-L-Alanyl-D-isoGlutamine (MDP pour muramyl dipeptide).

Brièvement, ils sont capables d'exercer une grande variété d'activités biologiques incluant une activité immuno-adjuvante, une activité anti-infectieuse, une activité anti-tumorale, une activité anti-allergique et une régulation de la sécrétion des
25 cytokines. Cependant, un certain nombre de ces muramyl peptides, s'ils peuvent présenter des activités biologiques tout à fait prometteuses, présentent souvent des effets secondaires ou des inconvénients qui en empêchent leur utilisation à titre de médicament, notamment des effets toxiques ou une difficulté de formulation du fait de leur faible solubilité dans des solutions aqueuses.

30 Ils présentent en outre une grande variabilité dans leur spectre d'action.

Très récemment, il a été montré que les muramyl peptides diesters de formule générale (I) ci-dessous et, en particulier, le Muradimétide possèdent la propriété particulière d'être immunostimulants ce qui présente à la fois des avantages d'efficacité, de formulation, et de non toxicité, cumul d'avantages qui

n'avait pas été observé pour d'autres dérivés du MDP ; en particulier, un immunomodulateur actif par administration par voie externe, notamment par voie orale, par aérosol, peut permettre d'envisager une utilisation plus large et plus souple de cet immunostimulant ; l'avantage de bonne tolérance se retrouve également quand ce dérivé est administré par voie générale.

L'essentiel des propriétés déjà décrites sur les dérivés de MDP est lié à un renforcement du système immunitaire humoral ou cellulaire.

De façon surprenante, la présente invention résulte de la découverte selon laquelle certains types de dérivés du MDP représentés ci-après par les formules (I), (II), (III) en association le cas échéant avec un composé de formule (IV) ou les conjugués de formules (V) et (VI) sont capables d'augmenter le taux d'éléments figurés normaux et immatures du sang et en particulier de neutrophiles dans le sang circulant, notamment après administrations de doses d'AZT susceptibles de diminuer considérablement le taux des leucocytes circulants. En effet, après administration de la composition pharmaceutique, on observe dans la circulation une augmentation de leucocytes normaux accompagnée d'une très forte augmentation de myélocytes/promyélocytes suivie d'une augmentation des neutrophiles et plus tardivement des lymphocytes. De façon tout à fait remarquable, cet effet s'observe très fortement même après un traitement combiné faisant intervenir des doses hautement myélotoxiques d'AZT.

Toutes les cellules sanguines dérivent de cellules souches communes dont l'origine est la moelle osseuse. Avant d'atteindre leur stade final de différenciation, ces cellules passent par différentes étapes : cellules souches pluripotentes pouvant se différencier soit en prolymphocytes T ou B, soit en cellules souches des lignées érythrocytaire, myélocytaire, granulocytaire et myélocaryocytaire. A ces différentes étapes intermédiaires, elles ne sont pas discernables morphologiquement et sont désignées par les termes promyélocyte/myélocyte pour les plus jeunes et métamyélocytes pour celles les plus proches de la différenciation.

Dans la suite du texte, l'ensemble de ces cellules non différenciées sera désigné par CSH pour « cellules souches hématopoïétiques ».

A l'état normal, le taux des CSH est de l'ordre de 1% des cellules blanches présentes dans le sang.

Il est intéressant d'activer l'hématopoïèse et de mobiliser des CSH dans les trois cas suivants :

- 1) pour contrecarrer les effets myélotoxiques de certaines drogues afin de maintenir un taux normal de cellules sanguines (en particulier de neutrophiles),
- 5 2) pour remplacer des biopsies de moelle osseuse par la récolte de taux élevés de CSH dans le sang circulant en vue de greffe homologe ou autologue de cellules de moelle,
- 3) pour obtenir à partir du sang circulant un taux élevé de CSH afin de les utiliser comme vecteurs pour la réalisation de certaines thérapies géniques.

10 1) Traitement anti-myélotoxique.

Certains traitements ou médicaments entraînent des effets myélotoxiques, tels les chimiothérapies du cancer ou du SIDA, des immunothérapies ou des radiothérapies, conduisant à un dysfonctionnement de la fonction hématopoïétique et augmentant ainsi dramatiquement les risques d'infections intercurrentes. La composition pharmaceutique de l'invention permet de
15 s'opposer à la diminution des cellules du système immunitaire, résultant de cette myélotoxicité et en particulier des neutrophiles.

En outre, certains traitements qui utilisent l'immunothérapie, notamment par les cytokines, peuvent également entraîner un effet cytotoxique pour lequel
20 les compositions de l'invention peuvent jouer un rôle d'antagoniste.

2) Obtention de cellules permettant de pratiquer des greffes de moelle osseuse.

Les traitements anticancéreux par chimiothérapie sévère ou par radiothérapie entraînent une destruction des cellules du sang et des cellules du
25 système immunitaire. Dans ces cas, on reconstitue le système hématopoïétique par greffe de cellules de la moelle osseuse. On pratique des greffes autologues quand le cancer affecte des cellules autres que celles de la moelle et dans ce cas les prélèvements se font chez le patient lui-même avant le traitement destructeur. On pratique des greffes homologues (c'est-à-dire en utilisant des
30 cellules provenant d'un donneur compatible) quand les cellules de la moelle sont elles-mêmes cancéreuses.

Dans les deux cas, il est extrêmement intéressant de pouvoir enrichir la moelle osseuse en cellules souches mais surtout de pouvoir en obtenir dans le sang circulant en nombre suffisamment élevé pour faciliter leur utilisation comme

greffons. En effet à l'heure actuelle, l'utilisation du sang pour la préparation de greffons enrichis en CSH demande des prélèvements nombreux et importants et donc étalés sur une longue période ; de plus il faut mettre en pratique une préparation pénible pour le malade et pour le donneur car l'enrichissement en CSH se fait par administration de cytokines coûteuses et parfois mal tolérées (GM-CSF) suivies de prélèvements sanguins nombreux et importants, l'ensemble de traitements nécessitant à chaque fois une hospitalisation. La composition pharmaceutique de l'invention permet d'obtenir le matériel nécessaire aux greffes de moelle chez des sujets ambulatoires et après quelques jours de traitement seulement, car elle est capable d'induire dans le sang, après environ 4 jours de traitement, une multiplication par 200 du nombre de CSH.

3) Obtention de cellules souches aisément purifiables utilisables pour la thérapie génique.

L'utilisation de certaines formes de techniques de thérapie génique dépendra de la possibilité d'obtenir des CSH en grande quantité dans le sang circulant. Cette obtention est possible grâce à la composition pharmaceutique de l'invention permettant d'obtenir un pourcentage extrêmement important de CSH dans le sang, alors que ces cellules sont très difficiles à purifier à partir de la moelle osseuse.

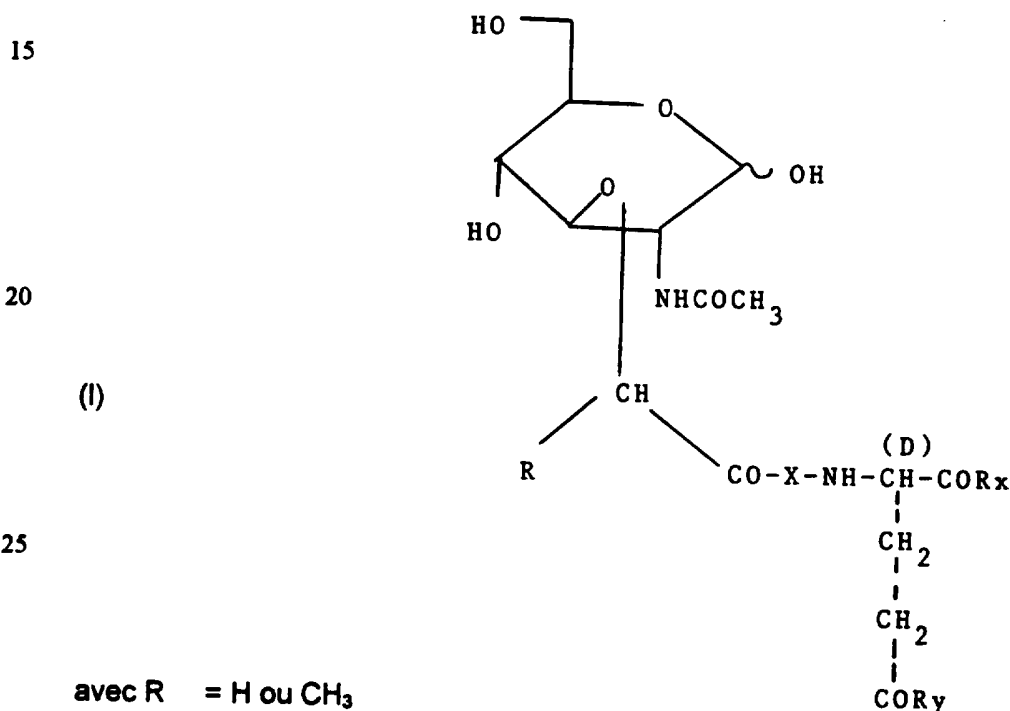
Les expériences précliniques et les essais cliniques de thérapie génique ont indiqué qu'il était nécessaire d'utiliser des cellules souches qui ont une longue durée de vie, un haut pouvoir d'expression et qui se répartissent dans tout l'organisme. Il est très généralement admis que les CSH sont des vecteurs de gènes particulièrement intéressants soit pour contrecarrer des déficits immunitaires telle la maladie de Gaucher ou les cas de déficits immunitaires profonds (SCID pour Severe Combined Immune Deficiencies), soit pour s'opposer au développement de cancers tels que myélome, leucémie, cancer du sein ou de l'ovaire, etc..., soit pour induire une résistance aux maladies infectieuses particulièrement le SIDA.

Pour répondre à ces objectifs, il est donc indispensable de disposer d'un nombre important de CSH aisément purifiables à partir du sang circulant par les techniques habituelles de séparation cellulaire et c'est justement ce que permet la composition de l'invention ou les médicaments la contenant.

La composition de l'invention permet d'envisager le développement de l'utilisation des cellules du sang circulant pour reconstituer la fonction hématopoïétique après destruction cellulaire grâce à une multiplication, qui peut atteindre un facteur 200, du pourcentage de CSH circulantes, alors qu'en l'absence de traitement, on ne peut en déceler plus de 1%.

Cet effet sur les CSH apparaît quel que soit le stade de différenciation desdites cellules souches comme le montre l'exemple 7 ci-après.

La présente invention, qui résulte de cette découverte des nouvelles propriétés de certains dérivés du MDP, est relative à une nouvelle composition pharmaceutique destinée à prévenir ou traiter l'effet myélotoxique de certains traitements ou maladies et/ou stimuler la fonction hématopoïétique caractérisée en ce qu'elle contient comme principe actif au moins un composé de la formule suivante (I) :



avec R = H ou CH₃

X = L-ALa ou L-Thr

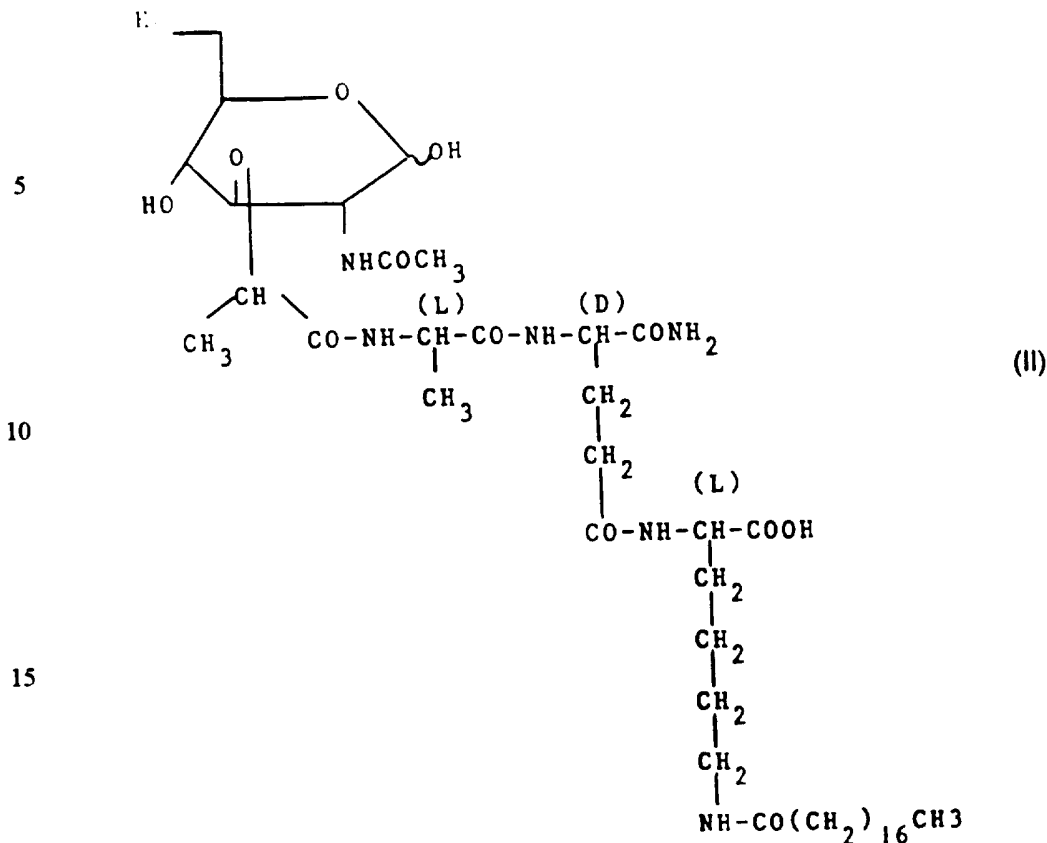
30 R_α = NH₂ ou O(CH₂)_xH avec x = 1 à 4

R_γ = OH (sauf si R_α = NH₂) ou

O(CH₂)_xH avec x = 1 à 4

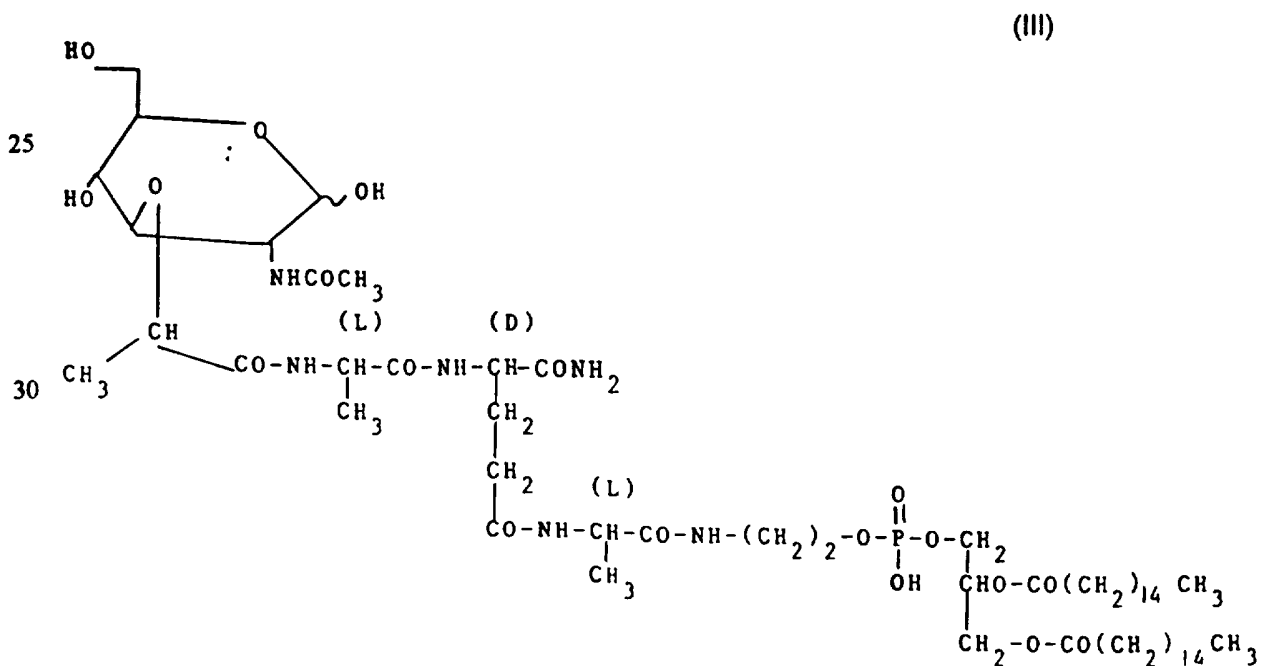
ou la muroctasine de formule (II) suivante :

Nac-Mur-L-Ala-D-isoGln-N² stearoyl-L-Lys.



ou le MTP-PE de formule (III) suivante :

20 Nac-Mur-L-Ala-D-isoGln-L-alanyl-2 (1', 2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)-ethylamide-mono-sodium)



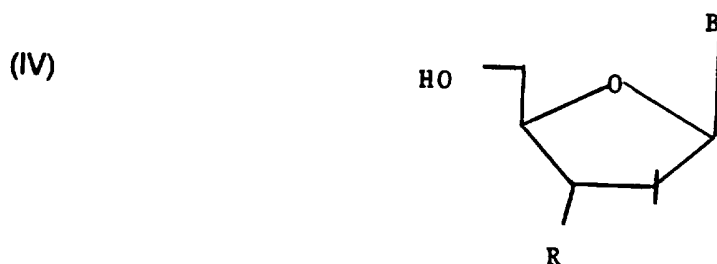
Un exemple particulièrement performant de composé répondant à la formule (I) est le Muradimétide de formule :

Nac-Mur-L-Ala-D-Glu[OMe]-OMe.

Cette composition permet de restaurer un taux normal ou supérieur à la normale des éléments figurés du sang, notamment les erythrocytes et les plaquettes.

L'effet recherché de ces composés est obtenu dans une composition où le dosage des composés de formule (I), (II) ou (III) est tel qu'il permet une administration par voie orale à des doses de 0,1 à 25 mg par kg de poids corporel chez l'homme ou l'animal ou par voie générale dans laquelle le principe actif est dosé de telle façon qu'il permet une administration de 0,05 à 2,5 mg par kg de poids et par dose.

Les traitements par l'AZT présentent l'inconvénient de la myélotoxicité. De façon surprenante, l'administration conjointe d'un dérivé de formule (I) ou (II) ou (III) avec un dérivé de nucléoside de formule générale (IV) ci-dessous conduit à une augmentation d'un facteur 10 à 300, et souvent autour de 200, du taux de CSH dans le sang et les compositions de l'invention contiennent de façon avantageuse, outre un dérivé de formule (I), (II), (III), un dérivé de formule (IV).



B étant une base purique ou pyrimidique

R = H, N₃, ou un halogène.

Un exemple de ce dérivé, est le 3'-Azido-3'-desoxy-thymidine (AZT). L'association peut également se faire avec tous les nucleosides présentant des activités myélotoxiques et anti-rétrovirales similaires à celle de l'AZT et notamment des nucléosides contenant du ribose et non du désoxyribose. Aussi

souvent que nous parlerons dans la suite de cette description de l'AZT, l'homme du métier saura que dans des utilisations similaires d'autres nucléosides peuvent être utilisés et être considérés comme équivalents de l'AZT.

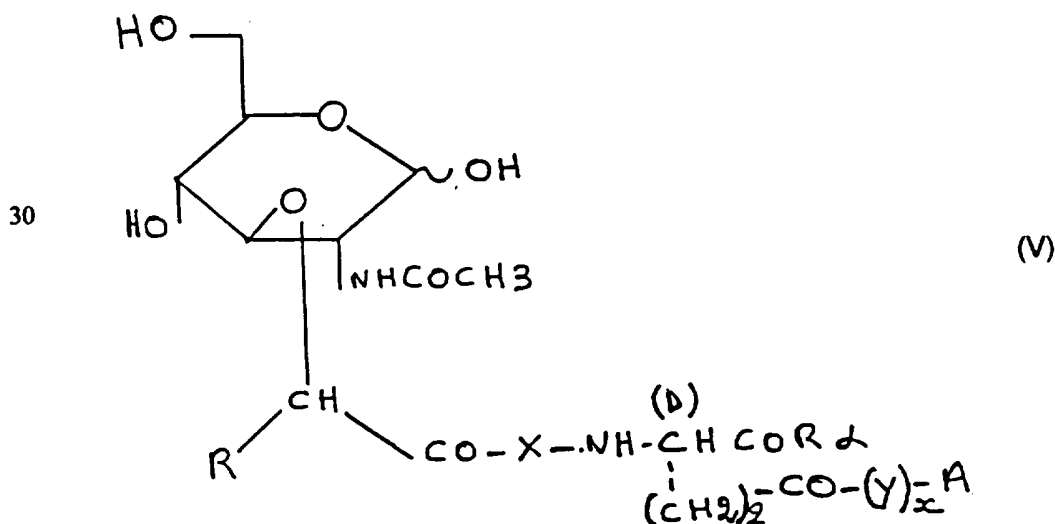
Quand l'AZT est associé au dérivé du MDP dans une composition de l'invention, cette dernière en contient une quantité permettant son administration à une dose comprise entre 1 et 150 mg/kg par voie orale ou par voie générale, cette dose journalière pouvant être administrée en une fois ou fractionnée.

L'administration simultanée de dérivés de MDP de formule (I) (II) ou (III) avec un dérivé de formule (IV) peut être réalisée :

- 10 - soit au sein d'un médicament contenant au moins ces deux composés, un tel médicament faisant partie de l'invention,
- soit par l'administration simultanée de deux médicaments dont chacun contient un type de composé, administration simultanée signifiant que les composés peuvent exercer leurs effets pendant au moins une période de recouvrement,
- 15 - soit par la réalisation de conjugués associant dans une même molécule les composés de formule (I) et (IV).

Par administration simultanée il est bien entendu que l'administration peut être faite dans une même formulation par voie générale ou par voie orale ou au contraire dans deux formulations différentes et administrées dans un intervalle de temps suffisamment réduit pour que les effets de l'un ou l'autre principe actif se fasse sentir simultanément.

L'invention est également relative à des conjugués présentant un effet antimyélotoxique ou permettant de mobiliser les cellules souches hématopoïétiques dans le sang circulant caractérisé par l'une des formules suivantes :



avec R = H ou CH₃

R_α = NH₂ ou O(CH₂)_xH avec x = 1 à 4

X = L-Ala ou L-Thr

x = 0, 1 ou 2

5 Y = un résidu d'acide aminé

avec A étant un nucléoside comportant, en position 5', du résidu désoxyribose soit une fonction hydroxyle, soit une fonction amine, et en position 3' un hydrogène, un halogène ou un groupement azide.

Un conjugué avantageux répondant à la formule (V) est celui où :

10 R = CH₃

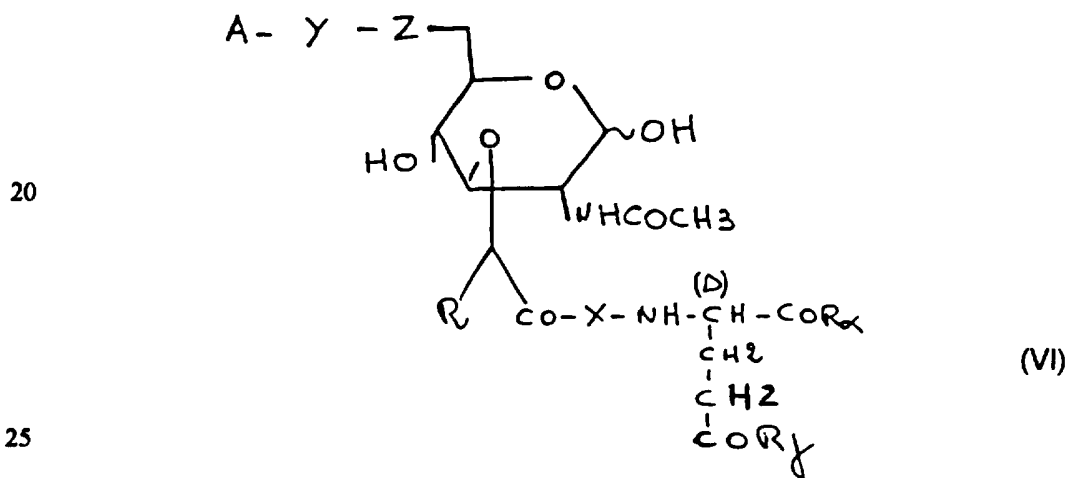
X = L-Ala

x = 1

Y = L-Ala

R_α = OCH₃

15 Un autre conjugué de l'invention répond à la formule :



dans lequel

X = L-Ala ou L-Thr

30 Y est un bras, tel qu'un acide dicarboxylique notamment un résidu succinyle,

Z = O ou NH,

R = H ou CH₃,

R_α et R_γ ont la signification donnée dans la formule (I),

avec A étant un nucléoside comportant, en position 5', du résidu désoxyribose

soit une fonction hydroxyle, soit une fonction amine, et en position 3' un hydrogène, un halogène ou un groupement azide.

Un conjugué avantageux répondant à la formule (VI) est celui où :

X = L-Ala

5 R = CH₃

R_α = OCH₃ et R_γ = OCH₃

Y = CO-(CH₂)₂-CO

Z = O

A est l'AZT.

10 La présente invention est également relative aux compositions pharmaceutiques utilisables comme antagonistes des effets myélotoxiques de certains traitements ou médicaments caractérisée en ce qu'elle contient comme principe actif un conjugué de formule V ou VI en association avec un véhicule pharmaceutique acceptable pour une administration per os ou pour une
15 administration par voie générale.

Ces composés sont nouveaux et leurs procédés de synthèses font partie de l'invention.

Pour synthétiser les composés de formule (V), les fonctions amines ou hydroxyles existant éventuellement dans le résidu de base purique ou
20 pyrimidique d'un 2'-désoxyribonucléoside sont temporairement masquées par des groupements de protection temporaire ; la fonction en position 5' du dérivé nucléosidique peut être éventuellement transformée en fonction amine par l'intermédiaire d'un groupement mesyle modifiable en un azide finalement hydrogénable en fonction amine; la fonction en position 3' du dérivé nucléoside
25 peut être soit un hydrogène, un halogène ou un groupe azide, soit un groupe mesyle ultérieurement remplaçable par des nucléophiles tels que azide ou halogène.

La fonction hydroxyle ou amine en position 5' du dérivé nucléosidique est couplée notamment par une méthode aux anhydrides mixtes ou bien au
30 carbodiimide en utilisant éventuellement certains additifs tels que l'imidazole, l'hydroxybenzotriazole ou encore le DMAP (Di-méthyl-aminopyridine), à un dérivé de Muramyl-peptide de formule (I) dans laquelle R_γ est un hydroxyle ou un résidu d'acide aminé.

Si R_γ est un résidu d'acide aminé, il est possible d'effectuer d'abord le

couplage du dérivé nucléosidique avec l'acide aminé protégé, puis le couplage après déprotection, à un dérivé muramyl-peptide de formule (I) dans laquelle la fonction γ -carboxyle du résidu glutamyle est libre.

En fin de procédure, pour obtenir les conjugués de type (V), les groupements de protection temporaires qui peuvent exister sont éliminés, et, éventuellement, le groupement mesyl en position 3' transformé en un azide ou un halogène.

Une variante consiste à coupler (i) la fonction hydroxyle ou amine en position 5' du dérivé nucléosidique avec un acide aminé protégé, puis par étapes successives, selon des techniques utilisées en synthèse peptidique, (ii) un dérivé de l'acide D-glutamique convenablement protégé, (iii) un dérivé protégé de la L-alanine ou de la L-thréonine, (iv) un dérivé protégé de l'acide N acétylmuramique. En fin de procédure, pour obtenir les conjugués de type (V), les groupements de protection temporaires sont finalement éliminés et, éventuellement, le groupement mesyle en position 3' transformé en un azide ou en un halogène.

Pour synthétiser un composé de formule (VI), les fonctions amines ou hydroxyles existant éventuellement dans le résidu de base purique ou pyrimidique d'un 2'-désoxyribonucléoside sont temporairement masquées par des groupements de protection temporaire ; la fonction en position 5' du dérivé nucléosidique peut être éventuellement transformée en fonction amine par l'intermédiaire d'un groupement mesyle modifiable en un azide finalement hydrogénable en fonction amine.

La fonction en position 3' du dérivé nucléoside peut être soit un hydrogène, un halogène ou un groupe azide, soit un groupe mesyle ultérieurement remplaçable par des nucléophiles tels que azide ou halogène.

La fonction hydroxyle ou amine en position 5' du dérivé nucléosidique est couplée notamment par une méthode aux anhydrides mixtes ou bien au carbodiimide en utilisant éventuellement certains additifs tels que l'imidazole, l'hydroxybenzotriazole ou encore le DMAP, à un dérivé Muramyl-peptide de formule (VI) dans laquelle A étant inexistant :

l'hydroxyle anomérique (C1) est ou non protégé temporairement,

Z est NH ou O,

Y est un résidu acide di-carboxylique, notamment un résidu succinyle.

De tels dérivés Muramyl-peptides sont préparés à partir de dérivés

Muramyl-peptides de formule (I), dont le mode de synthèse est désormais bien connu, avec l'hydroxyle anomérique (C1) protégé temporairement par un benzyl glycoside hydrogénolysable ou tout autre groupement adéquat, et les hydroxyles en position 4 et 5 protégés par des groupements benzylidènes hydrogénolysables ou isopropylidènes acidolysables. L'élimination de cette protection temporaire permet soit de libérer la fonction hydroxyle primaire (C6) et de la substituer par un groupe succinyle par exemple, soit de la transformer en fonction amine par l'intermédiaire d'un groupement mesyle modifiable en azide finalement hydrogénable en fonction amine. Cette fonction amine est alors substituée par un groupe succinyle par exemple.

En fin de procédure pour aboutir aux conjugués de type (VI), les groupements de protection temporaires qui peuvent exister sont éliminés et, éventuellement, le groupement mesyle en position 3' transformé en un azide ou un halogène.

La présente invention est également relative à l'utilisation d'un composé de formule (I), (II), (III) (V) ou (VI) dans la fabrication d'un médicament antagoniste des effets myélotoxiques de certains traitements ou médicaments ou permettant la stimulation de la fonction hématopoïétique dans la circulation générale seul ou en association avec un composé de formule (IV).

Une telle utilisation est particulièrement recommandée pour contrecarrer les effets myélotoxiques de certaines chimiothérapies pour traiter le sida ou certains cancers.

Par association on entend que les deux composés sont administrés soit dans la même composition pharmaceutique, soit dans une composition différente, les deux compositions étant alors administrées à l'homme ou à l'animal dans un intervalle de temps tel que au moins une partie des effets de l'un et de l'autre composant se produisent simultanément.

Une telle utilisation permet au médicament en question d'enrichir le sang circulant en cellules souches hématopoïétiques ; cet enrichissement est particulièrement avantageux soit lorsque l'on souhaite pratiquer des greffes de moelle osseuse, soit des autogreffes, soit des allogreffes, ou bien encore pour utiliser les CSH pour pratiquer des thérapies géniques, car comme il a été expliqué plus haut les cellules totipotentes que sont les CSH sont les meilleurs candidats pour une bonne expression d'un gène hétérologue après réinjection au

patient par voie générale. Il est alors nécessaire de disposer à un temps donné de très fortes concentrations de CHS dans le sang ; il est alors opportun de donner pendant un intervalle de temps court des doses d'AZT supérieures aux doses habituelles qui sont préconisées pour des administrations répétées sur de longues périodes ; il est à noter en outre que les doses d'AZT administrées sont
5 similaires et se situent dans les mêmes gammes que l'administration soit par voie parentérale, par voie orale ou par voie générale.

Cette utilisation est caractérisée en ce que le composé de formule (I) est le Muradimétide de formule

10 Nac-Mur-L-Ala-D-Glu[OMe]-OMe,

ou en ce que le dérivé de formule (II) est la muroctasine ou en ce que le dérivé de formule (III) est le MTP-PE.

Le composé de formule (IV) est la 3'-Azido-3'-desoxy-thymidine (AZT) dans une utilisation préférée de l'invention.

15 L'invention porte enfin sur les méthodes de traitement par les compositions de l'invention afin de compenser les effets myélotoxiques de certaines chimiothérapies, ou encore d'augmenter la concentration de CHS dans le sang.

Les exemples suivants sans caractère limitatif sont destinés à montrer l'effet tout à fait surprenant d'un des composés de la famille dans leur nouvelle
20 utilisation. Ils sont effectués chez la souris, et illustrés par les tableaux 1, 2 et 3 qui sont placés dans le texte et par les figures 1 à 8 dont la signification est décrite ci-dessous, illustrent sans ambiguïté l'effet particulier d'un des composants de la classe couverte par la formule (I) à savoir le Muradimétide, à la fois sur l'effet antimyélotoxique et sur la mobilisation des CSH dans la circulation
25 sanguine, cet effet n'étant pas retrouvé chez d'autres dérivés de MDP comme le MDPA ni par des lymphokines utilisées habituellement pour stimuler les myélocytes tel le GM-CSF.

La figure 1 montre l'effet d'un traitement per os des souris avec du Muradimétide en association avec des doses d'AZT non myélotoxiques (5 mg par
30 kg) (Fig 1A) ou myélotoxiques (40mg par kg) (Fig 1B) sur le changement des leucocytes circulants.

La figure 2 représente le même type de courbe sur la numération des neutrophiles ; la figure 2A représente une expérience réalisée avec une dose non myélotoxique d'AZT (5 mg par kg) et la figure 2B avec une dose myélotoxique

d'AZT (40 mg par kg).

La figure 3 représente le même type de courbe sur la numération des myélocytes. La figure 3A se rapporte à une dose non myélotoxique d'AZT (5mg/kg) et la figure 3B à une dose myélotoxique (40 mg/kg).

5 La figure 4 représente les effets comparés du Muradimétide et du rmGM-CSF (recombinant mouse GM-CSF) sur la numération des neutrophiles circulants après administration d'AZT.

La figure 5 représente la même comparaison sur la numération des leucocytes circulants.

10 La figure 6 représente la même comparaison sur la numération de monocytes circulants.

La figure 7 représente la même comparaison sur la numération des myélocytes circulants.

15 La figure 8 représente l'effet d'un traitement per os des souris avec du Muradimétide sur le changement de la numération myélocyte dans le sang circulant induite suite à une administration intra-veineuse d'AZT, deux dérivés de MDP étant comparés : le MDPA (Nac-Mur-L-ALa-D-Glu) et le Muradimétide.

20 La figure 9 représente l'effet du traitement per os de souris BALB/c pendant 7 jours consécutifs avec de l'AZT, du Muradimétide (MDM) ou un mélange de ceux-ci sur la numération plaquettaire.

La figure 10 représente l'effet du traitement per os de souris BALB/c pendant 7 jours consécutifs avec de l'AZT, du Muradimétide (MDM) ou un mélange de ceux-ci sur le nombre des globules rouges.

25 La figure 11 représente l'effet d'un traitement per os de souris pendant deux semaines consécutives (4 jours par semaine) avec l'AZT, le Muradimétide ou le mélange des deux sur le nombre des myélocytes circulants.

La figure 12 représente la même expérience que celle représentée dans la figure 11 sur des souris ayant subi une ablation de la rate.

30 La figure 13 représente une expérience similaire sur des souris normales qui ont préalablement reçu un traitement par une drogue cytotoxique : la cyclophosphamide.

Exemple 1 - Activité du Muradimétide administré seul

Le tableau 1 ci-dessous représente les numérations des leucocytes,

neutrophiles, lymphocytes et myélocytes en fonction du temps après traitement par le Muradimétide seul administré à la dose de 25 mg/kg. Le traitement est effectué pendant 4 jours consécutifs par injection intraveineuse.

Tableau 1

- 5 Effet de 4 jours de traitement consécutifs des souris par voie veineuse avec le Muradimétide (25 mg/kg) sur les modifications du nombre de leucocytes circulants normaux (majoritairement neutrophiles et lymphocytes) et immatures (myélocytes).

Jour de la mesure	Nbre de Leucocytes (x 10 ⁵ /ml)	Nbre de Neutrophiles (x 10 ⁵ /ml)	Nbre de Lymphocytes (x 10 ⁵ /ml)	Nbre de Myélocytes (x 10 ⁴ /ml)
0	50 ± 14°	11 ± 3	38 ± 12	7 ± 6
2	52 ± 12	10 ± 3	41 ± 17	8 ± 8
3	52 ± 17	13 ± 5	35 ± 13	40 ± 5*
4	52 ± 15	12 ± 4	34 ± 8	72 ± 27*
7	50 ± 13	12 ± 4	38 ± 10	4 ± 4

10

° Moyenne ± déviation standard (3 souris par groupe).

* Significativement plus élevée que les valeurs au jour 0.

15 Ce tableau indique clairement que le Muradimétide administré seul induit aux jours 3 et 4 une augmentation du nombre de myélocytes circulants qui est hautement significative.

20 Exemple 2 - Effet d'un traitement par le Muradimétide sur l'augmentation du nombre de neutrophiles, leucocytes et myélocytes après un traitement par l'AZT.

Le traitement par l'AZT seul induit classiquement une diminution du nombre des leucocytes et des neutrophiles circulants. Cette diminution est suivie par une reconstitution intervenant environ 4 à 7 jours après le début du traitement. Quand le Muradimétide a été administré par voie générale ou par la

voie orale après un traitement par 40 mg/kg d'AZT, il n'y a pas de baisse du nombre de cellules et au contraire il y a une multiplication par au moins 1,5 du nombre de leucocytes et un triplement de celui des neutrophiles et cela dès après 4 jours. Les résultats sont représentés dans le tableau 2 ci-dessous.

5 Des souris CDI mâles (5 par groupe) ont été injectées avec de l'AZT à la dose de 40 mg par kg aux jours 0 à 3. Le Muradimétide est administré les mêmes jours à la dose de 10 mg par kg en intraveineux ou de 50 mg par kg per os. Les comptages cellulaires sont réalisés au jour 0 (avant le traitement), et aux jours 3 et 4.

10

Tableau 2 : Effet du traitement des souris par le Muradimétide par voie veineuse ou per os sur les modifications des comptages cellulaires induites par administration d'AZT (40 mg/kg) par voie veineuse :

Traitement (jours 0-3)	Jour de la mesure	Leucocytes (x 10 ⁶ /ml)	Neutrophiles (x 10 ⁶ /ml)	Myelocytes (x 10 ⁴ /ml)
eau physiologique	0	5.9 ± 1.5*	1.5 ± 0.4	14 ± 8
Muradimétide i.v; (10mg/kg)		6.0 ± 3.4 (NS) [°]	2.0 ± 1.3 (NS)	5 ± 7 (NS)
Muradimétide p.o (50 mg/Kg)		4.8 ± 0.4 (NS)	1.4 ± 0.5 (NS)	14 ± 13 (NS)
eau physiologique	3	4.2 ± 0.5*	1.0 ± 0.2	2 ± 4
Muradimétide i.v; (10mg/kg)		5.9 ± 2.9 (NS) [°]	1.5 ± 0.8 (NS)	145 ± 83 (0.0143)
Muradimétide p.o (50 mg/Kg)		6.1 ± 1.4 (NS)	1.6 ± 0.5 (NS)	123 ± 55 (0.0090)
eau physiologique	4	5.3 ± 1.0*	1.3 ± 0.5	33 ± 14
Muradimétide i.v; (10mg/kg)		7.6 ± 1.6 (0.0143) [°]	4.6 ± 1.5 (0.0143)	117 ± 46 (NS)
Muradimétide p.o (50 mg/Kg)		8.1 ± 2.9 (NS)	4.3 ± 2.47 (0.0472)	138 ± 59 (0.0090)

15 * moyenne ± déviation standard (5 souris par groupe)

° pas significativement différent du groupe traité par l'eau physiologique

Le tableau 2 montre l'augmentation spectaculaire du pourcentage de myélocytes

ou de promyélocytes en présence de Muradimétide quel qu'en soit le mode d'administration.

Exemple 3 - Effet du traitement combiné per os par l'AZT et le
5 Muradimétide sur les globules rouges et les plaquettes.

L'effet d'un traitement de 7 jours sur le nombre de globules rouges et de plaquettes est indiqué dans les figures 9 et 10 respectivement. Les numérations sont représentées en pourcentage de celles obtenues au jour 0. Des souris femelles BALB/c (5 par groupe) sont traitées une fois par jour pendant 7 jours
10 consécutifs par 100 mg/kg d'AZT (Δ), 50 mg/kg de muradimétide (\square) ou simultanément par 100 mg/kg d'AZT et 50 mg/kg de muradimétide (O). Les comptages de plaquettes ou de globules rouges ont été réalisés au jour 0 et jusqu'à 10 jours suivant le début du traitement. Aucune toxicité sur les plaquettes n'apparaît, que ce soit avec l'AZT, le muradimétide ou le mélange de ceux-ci. La
15 tendance à l'augmentation de leur nombre apparaît entre les jours 4 et 5. En revanche, l'anémie qui pourrait être observée dans les groupes traités pourrait être due aux saignements répétés ; néanmoins la vitesse et l'importance de l'anémie est grandement réduite chez les animaux traités avec le mélange des deux produits en comparaison avec celui observé dans le groupe traité par l'AZT
20 seul. Cela suggère un effet potentiel du mélange pour compenser la toxicité de l'AZT non seulement sur les leucocytes mais également sur les globules rouges.

Exemple 4 - Mobilisation des CSH après un traitement combiné per os par l'AZT et le Muradimétide.

25 Le tableau 3 ci-dessous et la figure 11 indiquent l'effet d'un traitement per os des souris avec du Muradimétide avant, en même temps ou après l'AZT administré à 50 mg par kg, sur le nombre de myélocytes circulants testés 24 heures après 4 administrations quotidiennes.

Tableau 3

Temps du traitement p.o. par		n =	Nbre de myélocytes circulants (x 10 ⁴ /ml)	P- Value
AZT (50mg/Kg)	Muradimétide (25mg/Kg)			
0 h	-	5	6 ± 8 ^Δ	-
-	0 h	5	17 ± 15	NS
0 h	0 h	5	215 ± 51	0.0090
0 h	-4 h	5	194 ± 50	0.0090
-4 h	0 h	5	187 ± 42	0.0090

Le nombre moyen de myélocytes circulant avant le traitement se situe entre 3 et 15 X 10⁴ cellules par ml dans les 5 groupes.

5 La « P-value » a été calculée par le test Mann Whitney U Rank.

NS signifie que la différence n'est pas significative. Ce tableau confirme que l'augmentation des myélocytes circulants est d'environ 200 quand il y a effet conjoint de l'AZT et du Muradimétide. Les deux constituants de la combinaison ont été administrés per os soit simultanément soit à des temps séparés.

10 La figure 11 montre l'effet d'un traitement par le MDM à 25 mg/kg (X), de l'AZT à 50 mg/kg (O) et du mélange des deux (□) sur le comptage des myélocytes de souris traitées pendant 2 semaines aux jours 0, 1, 2, 3 de la première semaine et 7, 8, 9, 10 de la deuxième semaine. Il apparaît clairement que le muradimétide seul et surtout le mélange de muradimétide et d'AZT ont un effet significatif sur la mobilisation des CHS alors que l'AZT seul n'a strictement
15 aucun effet. Si l'effet est surtout marqué au niveau de la première semaine, cela montre que le traitement nécessite un certain espace de temps entre les différents cycles de traitement et que des traitements répétés pourraient, le cas échéant, être utiles.

20

Exemple 5 - Effet d'un traitement per os d'AZT, de MDM et d'un mélange de ceux-ci sur le comptage de myélocytes circulants de souris splénectomisées.

Il est connu chez la souris qu'en sus de la moelle le seul organe ayant une activité hématopoïétique est la rate. Ainsi pour déterminer si l'effet du

mélange MDM + AZT sur la mobilisation des CHS provient de la rate ou de la moelle, de l'AZT à 50 mg/kg (O), du MDM à 25 mg/kg (Δ) et le mélange de ceux-ci (O) ont été administrés chez des souris qui avaient été splénectomisées 10 jours plus tôt. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 12 où il est évident que l'administration du mélange pendant 4 jours successifs conduit à une apparition très nette des myélocytes circulants dans la circulation périphérique, et ce avec une intensité similaire à celle observée chez des souris normales (figure 11) et l'augmentation des CHS apparaît dès la deuxième injection. Ceci implique clairement que cette mobilisation des CHS provient de la moelle et non pas de la rate ce qui est extrêmement important pour la transposition d'un tel traitement chez l'homme chez qui c'est la moelle osseuse qui est très majoritairement responsable de la fonction hématopoïétique.

Exemple 6 - Effet de l'administration orale d'AZT, MDM ou le mélange de ceux-ci sur la mobilisation des CSH de souris traitées par le cyclophosphamide.

L'effet du traitement ci-dessus pour compenser l'effet cytotoxique des chimiothérapies a été étudié en traitant les souris par le cyclophosphamide.

Les souris traitées par une simple injection sous-cutanée de cyclophosphamide (dose de 200 mg/kg) au jour 0 ont été ensuite divisées entre 4 groupes et ont reçu oralement, outre de l'eau physiologique (X), de l'AZT à 50 mg/kg (\square), du MDM à 25 mg/kg (Δ) ou du mélange de ceux-ci (O). Le traitement oral a été effectué aux jours 0, 1, 2 et 3 et les numérations cellulaires ont été évaluées jusqu'à 14 jours après le commencement du traitement. Les résultats sont indiqués dans la figure 13. Là-encore, il apparaît évident qu'une très forte mobilisation a lieu surtout en présence du mélange d'AZT et de MDM. Un effet similaire mais nettement moins marqué du MDM administré seul a également été observé sur la numération des neutrophiles circulants.

Exemple 7 - Effet des compositions de l'invention sur la mobilisation des CSH selon leurs différents stades de différenciation.

Ces expériences ont pour objet la mise en évidence des différentes populations de CSH présentes dans le sang circulant.

Ont été recherchés les stades suivants depuis les plus primitifs décelables en culture et qui ne présentent aucun signe de différenciation comme les CFAC

(Cobblestone Area Forming Cells) et LTC-IC (Long Term Culture - Initiating Cells) jusqu'au GM-CFU (Granulocyte Macrophage - Colony Forming Units) en passant par des stades intermédiaires comme les HPP et LPP-CFU (respectivement High Proliferating Potential and Low Proliferating Potential CFU). Dans tous les cas, les conditions de cultures, en particulier leur durée, ont été choisies pour permettre une détection optimale des différentes populations considérées.

Ont été comparés pour cette étude l'effet de l'injection de saline (X-), d'AZT à 50 mg/kg, du MDM à 25 mg/kg et le mélange des deux sur le nombre de CSH circulants. Les cellules mononucléaires après purification ont été cultivées pendant 5 jours pour dénombrer les GM-UFC (pour granulocytes - macrophages unités formant colonies), pendant 28 jours pour dénombrer les unités formant colonies à bas potentiel prolifératif (LPP) et les UFC à haut potentiel prolifératif (HPP). Les CAFC ont été dénombrés après 14 jours de culture. Les LTC-IC après 28 jours. Les résultats sont présentés sur les figures 14a, 14b, 14c et 14d respectivement. Les souris (10 Balb/c par groupe) ont reçu une fois par jour et pendant trois jours consécutifs, soit de l'eau physiologique, soit de l'AZT, soit du MDM ou le mélange des deux dans les conditions de doses ci-dessus. Vingt-quatre heures après la dernière administration, le sang de toutes les souris dans chaque groupe a été collecté. Pour les expériences représentées sur les figures 14a, 14b et 14c, les cellules mononucléaires ont ensuite été séparées sur gradients de densité et cultivées dans un milieu semi-solide pendant une période de cinq jours pour les GM-CFU et de 28 jours pour les LPP-CFU. Dans toutes ces courbes, l'effet du MDM seul et surtout du mélange de MDM et d'AZT apparaît clairement.

Pour mesurer l'effet du traitement sur les CAFC et les LTC-IC, le sang a été collecté 24 heures après la dernière administration de produit puis les cellules mononucléaires ont été purifiées et cultivées à différentes densités cellulaires sur une couche nourricière de cellules irradiées. Le comptage a été réalisé 14 jours après la mise en culture et est présenté comme un pourcentage de nombre de cellules obtenues dans les cellules contrôles traitées par de l'eau physiologique. les chiffres présentent la moyenne de 3 ou 4 expériences indépendantes. Lorsque la culture est poursuivie pendant 28 jours, des cellules des LTC-IC (pour Long Term Culture Initiating Cells) se forment et l'effet des traitements sur la formation de ces cellules après 28 jours de traitement est similaire à celui

observé dans le cas du CAFc.

Toutes ces expériences montrent l'effet particulièrement performant du traitement simultané d'AZT et du MDM, par voie orale, sur la mobilisation des CSH à tous les stades de différenciation.

5

Exemple 8 - Effet d'un traitement per os des souris avec du Muradimétide en association avec des doses non myélotoxiques ou myélotoxiques d'AZT sur les changements des comptes de leucocytes et de neutrophiles circulants.

Cet effet est indiqué sur les figures 1 et 2, les figures 1A et 2A
10 représentant une dose non myélotoxique d'AZT et les figures 1B et 2B représentant une dose myélotoxique d'AZT.

Dans cette expérience, des souris Swiss femelles ont été injectées par voie intra-veineuse avec de l'AZT à la dose de 5 ou de 40 mg par kg aux jours 0, 1, 2 et 3. Sur chacun des 4 jours et 4 heures avant l'administration d'AZT, des
15 groupes de souris constitués de 5 individus ont reçu per os soit du tampon soit du Muradimétide à la dose de 25 mg par kg.

Les comptages cellulaires sont effectués aux jours 0, 1, 2, 3, 4 et 7. Les étoiles au-dessus des histogrammes indiquent que les résultats obtenus sont significativement différents des niveaux observés avant le traitement.

20 La figure 3 représente la même expérience dans laquelle les myélocytes sont comptés.

Dans ces trois figures 1, 2 et 3, il est clair que l'effet est maximum 4 jours après le début du traitement. Ceci s'explique aisément par le fait que les leucocytes et les neutrophiles ont tendance après cette stimulation à retrouver
25 leur niveau normal, et pour ce qui concerne les myélocytes, le retour au niveau de base signifie que cette stimulation artificielle est tout à fait intéressante pour les cas cités ci-dessus (thérapie génique, greffe de moelle, autogreffe, etc...). La disparition de cet effet est normale du fait que les CSH se différencient en cellules matures et/ou s'installent dans les organes.

30

Exemple 9 - Comparaison des effets du Muradimétide et du GM-CSF.

Lorsque les souris ayant reçu un traitement par l'AZT sont traitées par du GM-SCF dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le Muradimétide, les comptages de leucocytes et de neutrophiles ne présentent pas

d'augmentation contrairement à ce qui est observé lorsque la combinaison AZT-Muradimétide est utilisée. Par contre, on observe une augmentation du nombre des monocytes. Les figures 4, 5, 6, et 7 indiquent l'effet d'un traitement des souris avec du Muradimétide ou avec du mGM-CSF sur les changements respectivement dans les neutrophiles circulants, dans les leucocytes circulants ou dans les monocytes circulants ou dans les myélocytes circulants après une administration intraveineuse d'AZT.

Les souris Swiss femelles ont été traitées par voie intra-veineuse avec 40 mg par kg d'AZT aux jours 0, 1, 2 et 3. Les groupes de souris (5 par groupe) reçoivent 4 heures avant l'AZT soit de l'eau physiologique, soit du Muradimétide à 25 mg par kg ou du mGM-CSF à 125 µg par kg par voie intraveineuse. Les comptages sont réalisés aux jours 0, 2, 3, 4 et 8. Les étoiles au-dessus des histogrammes indiquent qu'il existe une différence significative du comptage au regard des valeurs obtenues avant le traitement au jour 0. On voit donc que si le mGM-CSF est capable d'entraîner une augmentation du nombre de monocytes, le Muradimétide a un effet nettement marqué sur les neutrophiles et les leucocytes. De plus le Muradimétide contrairement au GM-CSF induit une très forte élévation des CSH dans le sang.

L'effet du Muradimétide comparé à celui du mGM-CSF est explicite sur la figure 7 qui montre clairement que le Muradimétide mobilise des CSH dans des conditions où le GM-CSF ne le fait pas.

Exemple 10 - Comparaison de l'effet du Muradimétide avec un autre dérivé du MDP.

Le dérivé utilisé pour mettre en évidence l'effet particulier du Muradimétide est le MDPA. La figure 8 indique l'effet sur des souris d'un traitement per os sur les changements de la numération de myélocyte induite suite à une administration intraveineuse d'AZT. Dans cette expérience, les souris swiss femelles ont été traitées de façon intraveineuse avec 40 mg par kg d'AZT aux jours 0, 1, 2 et 3. Des groupes de 5 souris ont reçu aux mêmes quatre jours et 4 heures avant l'AZT soit de l'eau physiologique, soit du MDPA à la dose de 25 mg par kg ou du Muradimétide par voie orale à la dose de 25 mg par kg. Les comptages de myélocytes ont été réalisés aux jours 0, 2, 3, 4 et 8. Les étoiles au-dessus des histogrammes ont la même signification que dans les diagrammes

précédents.

Il apparaît clairement que la propriété des dérivés de formule (I) et en particulier du Muradimétide n'est pas une propriété commune à tous les muramyl peptides. Ceci est particulièrement bien démontré par la comparaison avec le
5 MDPA dont le Muradimétide est le dérivé diester.

Exemple 11 - Synthèse de N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-glutamique α -méthyl ester γ -L-alanine 3'-azido-3'-deoxythymidine (formule V).

Cette synthèse comprend les étapes suivantes :

10 a) Synthèse de Boc-L-alanine 3'-azido-3'-deoxythymidine (1).

A 189mg (1mmole) de Boc-L-alanine dissous dans 20 ml de diméthylformamide anhydre contenant 102 mg (1mmole) de diméthylamino-pyridine sont ajoutés 206 mg (1mmole) de N-N'-dicyclohexylcarbodiimide. 267 mg (1mmol) de 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) sont ajoutés au mélange réactionnel qui est agité pendant
15 24 heures à la température ambiante. Après filtration du précipité de dicyclohexylurée, le mélange réactionnel est concentré sous vide. Le produit est finalement obtenu après purification sur colonne de gel de silice α -benzyl-N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-glutamique di-méthyl ester.

b) synthèse de L-alanine 3'-azido-3'-deoxythymidine, chlorhydrate (2) :

20 A 260 mg (0,6 mmole) de (1) sont dissous dans 2ml d'une solution 1N d'acide chlorhydrique dans l'acide acétique glacial. Après 30 minutes à température ambiante, le mélange réactionnel est concentré à sec. Le résidu obtenu est repris dans de l'acétone et concentré à sec. Le processus est répété plusieurs fois et le résidu, desséché sous vide, est directement utilisé à l'étape suivante : 225mg
25 (100%).

c) synthèse de N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-glutamique α -méthyl ester γ -L-alanine 3'-azido-3'-deox-thymidine(3) (formule V) :

A 507 mg (1 mole) de N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-glutamique α -méthyl ester () en solution dans 10 ml de diméthylformamide anhydre sont successivement
30 ajoutés à -15°C 0,11 ml (1 mmole) de N-méthylmorpholine et 0,13 ml (1mmole) de chlorocarbonate d'isobutyle. Après 5 minutes sont ajoutés 225 mg (0,60 mmole) de (2) en solution dans 5 ml de diméthyl formamide refroidie à -15°C, contenant 0,11 ml de N-méthylmorpholine. Le mélange réactionnel est agité pendant 24 heures à -15°C puis concentré sous vide. Le produit est finalement

obtenu après purification sur colonne de Lichroprep RP18 (Merck) par élution dans un mélange d'éthanol et d'eau. (3) est finalement obtenu par lyophilisation de sa solution aqueuse : 272 mg (60%).

5 Exemple 12 - Synthèse de 6-O-(Succinyl-3'-azido-3'-deoxythymidine)-N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-glutamique diméthyl ester (formule VI).

a) synthèse de α -Benzyl-N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-glutamique di-méthyl ester (1) :

1,4 g (2 mmole) de α -benzyl-4,6-OBzi-N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-glutamique di-méthyl ester (.) sont traités à reflux en présence de 100 ml d'acide acétique aqueux à 560% jusqu'à dissolution complète. Le mélange réactionnel est concentré sous vide. Le résidu obtenu est repris et concentré successivement dans de l'eau, du toluène et du méthanol, puis desséché sous vide. (1) est purifié sur colonne de gel de silice par élution avec un mélange de chloroforme et de méthanol : 305 mg (50%).

b) Synthèse de 6-O-succinyl-N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-glutamique di-méthyl ester (2) :

A 300 mg (1mmole) de (1) dissous dans 10 ml de pyridine anhydre. 44 mg (4 mmoles) d'anhydride succinique. Le mélange réactionnel est agité à température ordinaire pendant 4 jours, puis concentré sous vide. Le résidu obtenu est repris dans l'acétone et concentré plusieurs fois, puis desséché sous vide.

Le produit obtenu (α -benzyl-6-O-succinyl-N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-glutamique di-méthyl ester) est dissous dans 15 ml d'acide acétique glacial et hydrogéné en 4 heures à la pression atmosphérique en présence de 100 mg de Pd 5 % sur charbon. Après filtration du catalyseur, le mélange réactionnel est concentré sous vide. Le résidu obtenu est repris dans l'acétone et concentré plusieurs fois, puis déshéché sous vide. Il est alors repris dans l'eau et purifié sur colonne d'AG1X2 (H+)(BIORAD) par élution avec un gradient en acide acétique aqueux. (2) est finalement obtenu par lyophilisation de sa solution aqueuse : 450 mg (70%).

c) Synthèse de 6-O-(Succinyl-3'-azido-3'-deoxythymidine)-N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-glutamique di-méthyl ester (3) (formule VI) :

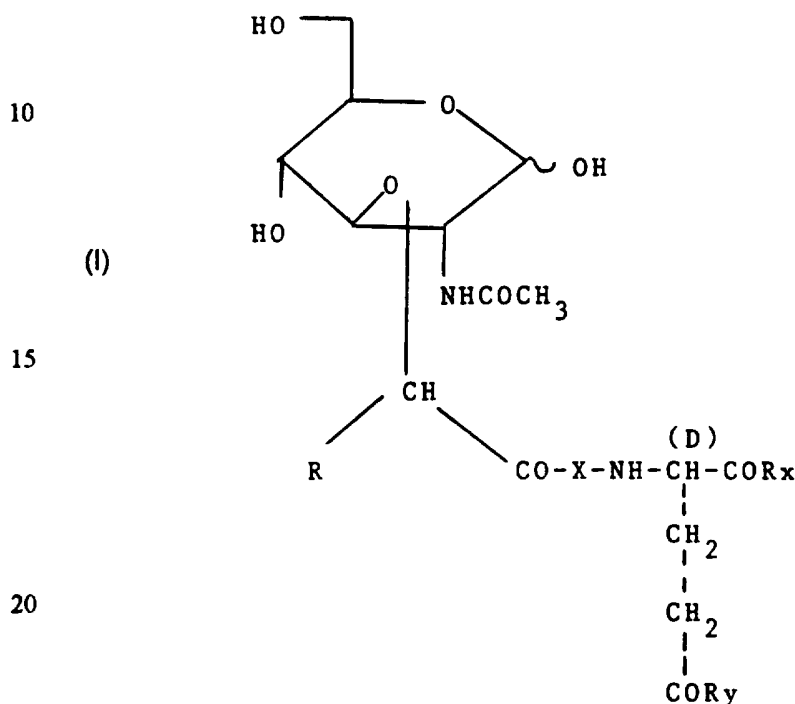
A 320 mg (0,5 mmole) de (2) en solution dans 10 ml de diméthylformamide anhydre sont successivement ajoutés à -15°C 0,05 ml (0,5 mmole) de N-

méthylmorpholine et 0,06 ml (0,5 mmole) de chlorocarbonate d'isobutyle. Après 5 minutes sont ajoutés 267 mg (1 mmole) de 3'-azido-3'deoxythymidine (AZT). Le mélange réactionnel est agité pendant 24 heures à 15°C puis concentré sous vide. Le produit est finalement obtenu après purification sur colonne de
5 Lichroprep RP18 (Merck) par élution dans un mélange d'éthanol et d'eau. (3) est finalement obtenu par lyophilisation de sa solution aqueuse : 440 mg (50%).

Les composés de formules (I), (II) et (III) d'une part en association ou non avec un dérivé de formule (IV), ou des nouveaux conjugués répondant aux formules (V) et (VI) qui sont en fait des liaisons covalentes des composés de
10 formule (I) avec des composés de formule (IV) offrent une nouvelle classe de médicaments présentant un spectre très large d'utilisation ; outre les exemples cités et revendiqués ils doivent pouvoir être utilisés dès que le rétablissement de la numération formulaire dans le sang est nécessaire ou lorsque pour une raison ou une autre l'accès aux myélocytes via la circulation sanguine est nécessaire.
15 Les CSH sont des cellules totipotentes d'une importance extrême comme il est expliqué au début de cette description. Grâce à cette invention, leur accès par un simple prélèvement sanguin, soit à titre d'outils biologique, soit à titre thérapeutique, devient possible sans manipulations longues et douloureuses.

REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique destinée à stimuler la fonction hématoïétique chez l'homme caractérisée en ce qu'elle contient comme principe actif au moins un composé de formule :



avec R = H ou CH₃

25 X = L-Ala ou L-Thr

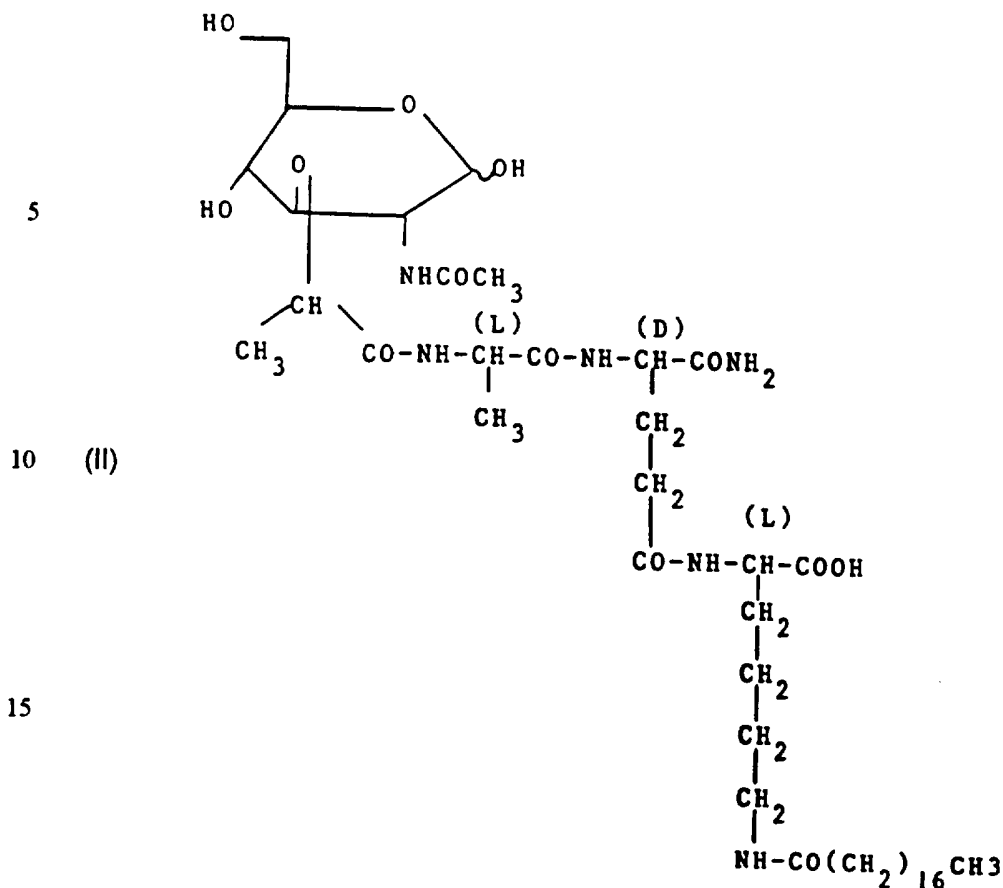
R_α = NH₂ ou O(CH₂)_xH avec x = 1 à 4

R_γ = OH (sauf si R_α = NH₂) ou

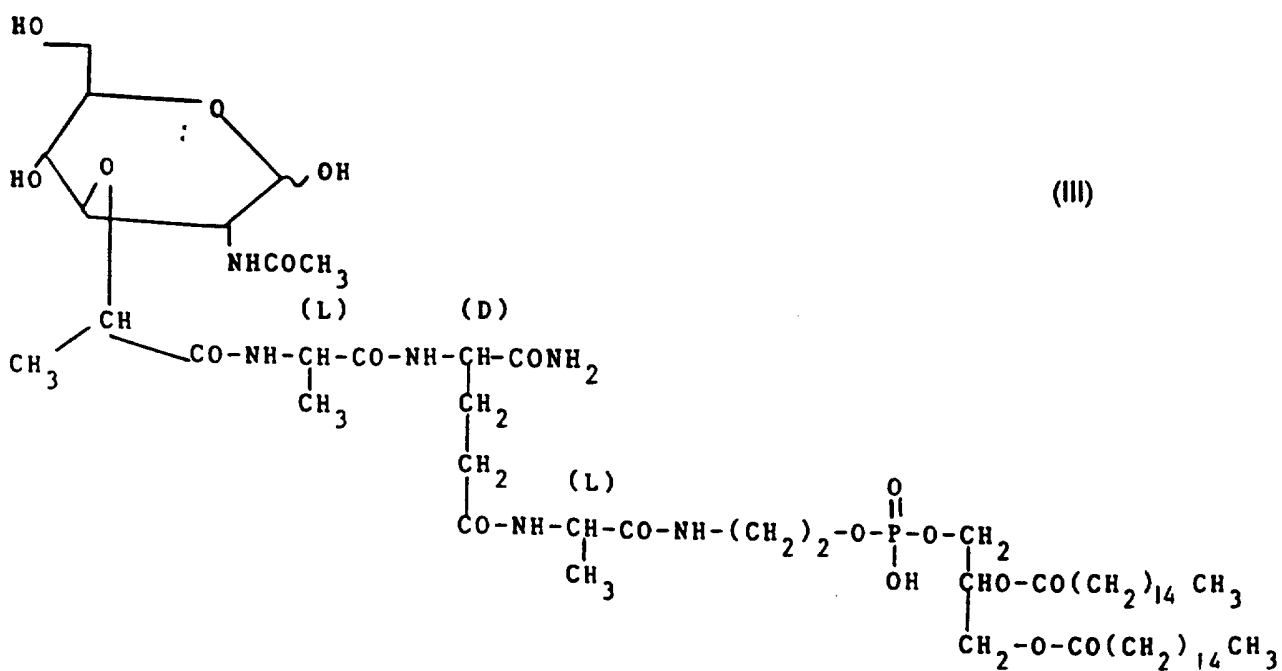
O(CH₂)_xH avec x = 1 à 4

ou la muroctasine de formule (II) suivante :

30 Nac-Mur-L-Ala-D-isoGln-N² stearyl-L-Lys.



20 ou le MTP-PE de formule (III) suivante Nac-Mur-L-Ala-D-isoGln-L-alayl-2
(1',2'dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl) ethylamide mono-sodium



2. Composition selon la revendication 1 caractérisée en ce que la stimulation de la fonction hématopoïétique permet de prévenir ou traiter l'effet myélotoxique de certains traitements ou maladies, ou d'enrichir le sang en cellules souches hématopoïétiques ou les deux simultanément.

5 3. Composition pharmaceutique selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce que le composé répondant à la formule (I) est le muradimétide de formule :
Nac-Mur-L-Ala-D-Glu[OMe]-OMe.

4. Composition selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisée en ce que le dosage des composés de formule (I) ou (II) ou (III) est tel qu'il permet une
10 administration par voie orale à des doses de 0,1 à 25 mg par kg de poids corporel chez l'homme.

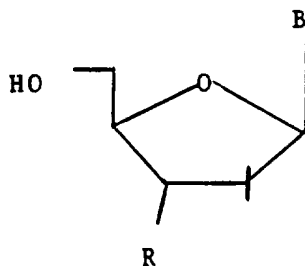
5. Composition selon l'une des revendications 1 à 3 administrable à l'homme par voie générale caractérisée en ce que le principe actif est dosé de telle façon qu'il permet une administration de 0,05 à 2, 5 mg par kg de poids et
15 par dose.

6. Composition selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisée en ce qu'elle contient en outre un dérivé de nucléoside de formule générale :

20

(IV)

25

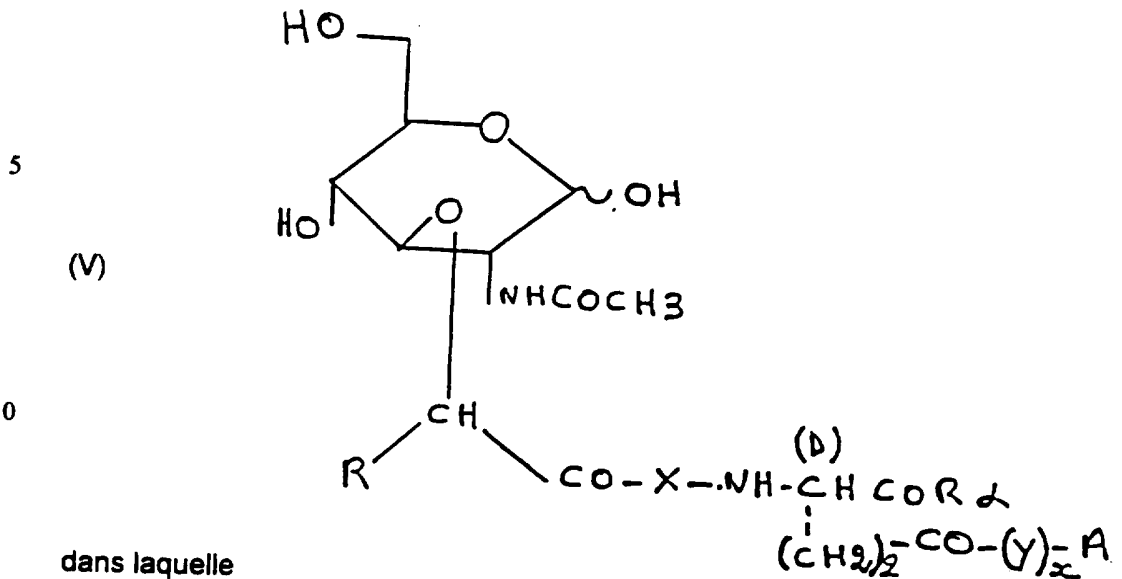


B étant une base purique ou pyrimidique

30 R = H, N₃, ou un halogène.

7. Composition selon la revendication 6 caractérisée en ce que le dérivé de nucléoside est la 3'-Azido-3'-desoxy-thymidine (AZT)

8. Conjugué caractérisé par sa formule (V):

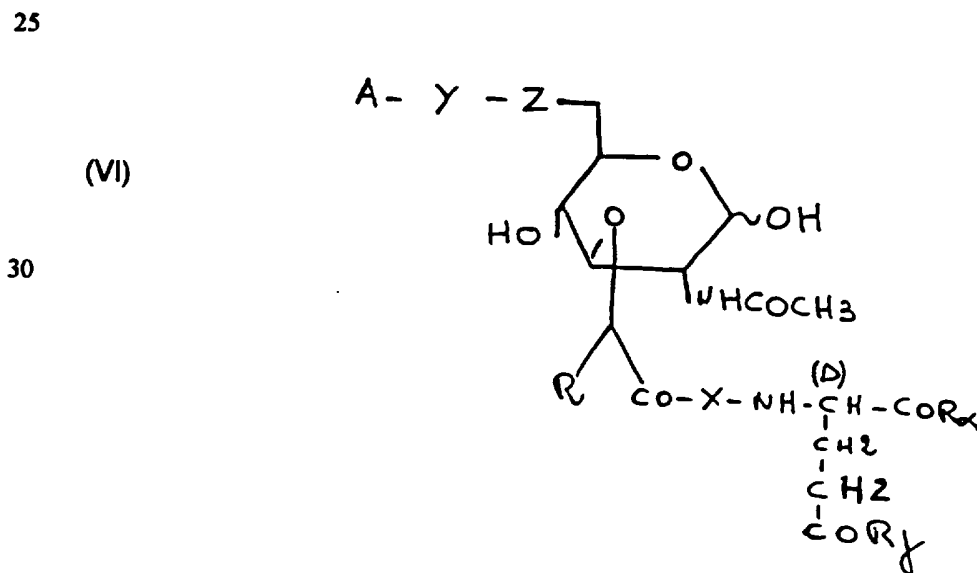


- 15
- R = H ou CH₃
 - R_α = NH₂ ou O(CH₂)_xH avec x = 1 à 4
 - X = L-Ala ou L-Thr
 - x = 0, 1 ou 2
 - Y = un résidu d'acide aminé

20

avec A étant un nucléoside comportant, en position 5', du résidu désoxyribose soit une fonction hydroxyle, soit une fonction amine, et en position 3' un hydrogène, un halogène ou un groupement azide.

9. Conjugué caractérisé par sa formule (VI) :



dans laquelle

x = 0 ou 1

X = L-Ala ou L-Thr

Y = est un bras, tel qu'un acide dicarboxylique notamment un
5 résidu succinyle

Z = est O ou NH

R = H ou CH₃

R_α et R_γ ont la signification donnée dans la formule (I),

avec A étant un nucléoside comportant, en position 5', du résidu désoxyribose
10 soit une fonction hydroxyle, soit une fonction amine, et en position 3' un
hydrogène, un halogène ou un groupement azide.

10. Conjugué selon la revendication 8 ou 9 caractérisé en ce que :

X = L-Ala

R = H

15 R_α = OCH₃ et R_γ = OCH₃

11. Conjugué selon l'une des revendications 8 ou 9 caractérisé en ce que A
est l'AZT.

12. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient, à titre
de principe actif, un conjugué selon l'une des revendications 8 à 11.

20 13. Composition pharmaceutique selon la revendication 12 caractérisée en
ce qu'elle permet de contrecarrer les effets myélotoxiques de certains traitements
ou médicaments tels les chimiothérapies du cancer ou du sida, les radiothérapies
ou les immunothérapies.

25 14. Composition selon la revendication 12 ou 13 caractérisée en ce qu'elle
permet de restaurer un taux normal ou supérieur à la normale des éléments
figurés du sang, notamment les érythrocytes et les plaquettes.

15. Composition pharmaceutique selon la revendication 12 caractérisée en
ce qu'elle permet d'enrichir le sang en cellules souches hématopoïétiques.

30 16. Procédé de synthèse d'un conjugué de formule (V) caractérisé en ce
qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

a) synthèse Boc-L-alanine 3'-azido-3'-deoxythymidine (1) à partir de Boc-L-
alanine et d'AZT,.

b) synthèse de L-alanine 3'-azido-3'-deoxythymidine, chlorhydrate (2) à partir de
(1).

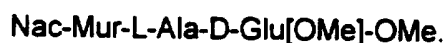
c) synthèse de N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-glutamique α -méthyl ester γ -L-alanine 3'-azido-3'-deox-thymidine(3) par addition de de N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-glutamique α -méthyl ester à (2).

17. Procédé de synthèse d'un conjugué de formule (VI) caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- a) Obtention de α -benzyl-N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-glutamique di-méthyl ester (1) à partir de α -benzyl-4,6-OBzi-N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-glutamique di-méthyl ester,
- b) Obtention de 6-O-succinyl-N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-glutamique di-méthyl ester (2) par succinylation de (1),
- c) Synthèse de 6-O-(Succinyl-3'-azido-3'-deoxythymidine)-N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-glutamique di-méthyl ester (3) en couplant à (2) de l'AZT.

18. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 7, ou d'un conjugué selon la revendication 8 à 11, ou d'une composition selon la revendication 12 dans la fabrication d'un médicament antagoniste des effets myélotoxiques de certains traitements ou médicaments ou permettant la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques dans la circulation générale seul ou en association avec un composé de formule (IV).

19. Utilisation selon la revendication 18 caractérisée en ce que le composé de formule (I) est le muradimétide de formule :



20. Utilisation selon la revendication 19 caractérisée en ce que le dérivé de formule (III) est le MTP-PE.

21. Utilisation selon la revendication 20 caractérisée en ce que le dérivé de formule (II) est la muroctasine.

22. Utilisation selon l'une des revendications 18 à 21 caractérisée en ce que le composé de formule (IV) est le 3'-Azido-3'-desoxy-thymidine (AZT).

23. Utilisation selon l'une des revendications 18 à 22 caractérisée en ce que le médicament est destiné à contrecarrer les effets des chimiothérapies dans les cas de traitement de cancers ou de SIDA.

24. Utilisation selon l'une des revendications 18 à 22 caractérisée en ce que le médicament permet d'enrichir le sang circulant en cellules souches hématopoïétiques.

25. Utilisation selon l'une des revendications 18 à 22 caractérisée en ce que le médicament permet l'obtention de cellules souches dans le sang utilisables comme vecteurs pour transférer des gènes hétérologues.

26. Utilisation selon l'une des revendications 18 à 22 caractérisée en ce
5 que le médicament permet l'obtention de cellules souches dans le sang utilisable dans des greffes autologues ou homologues de moelle osseuse.

27. Utilisation selon l'une des revendications 18 à 26 caractérisée en ce que les composés sont associés dans une formulation à un composé de formule IV.

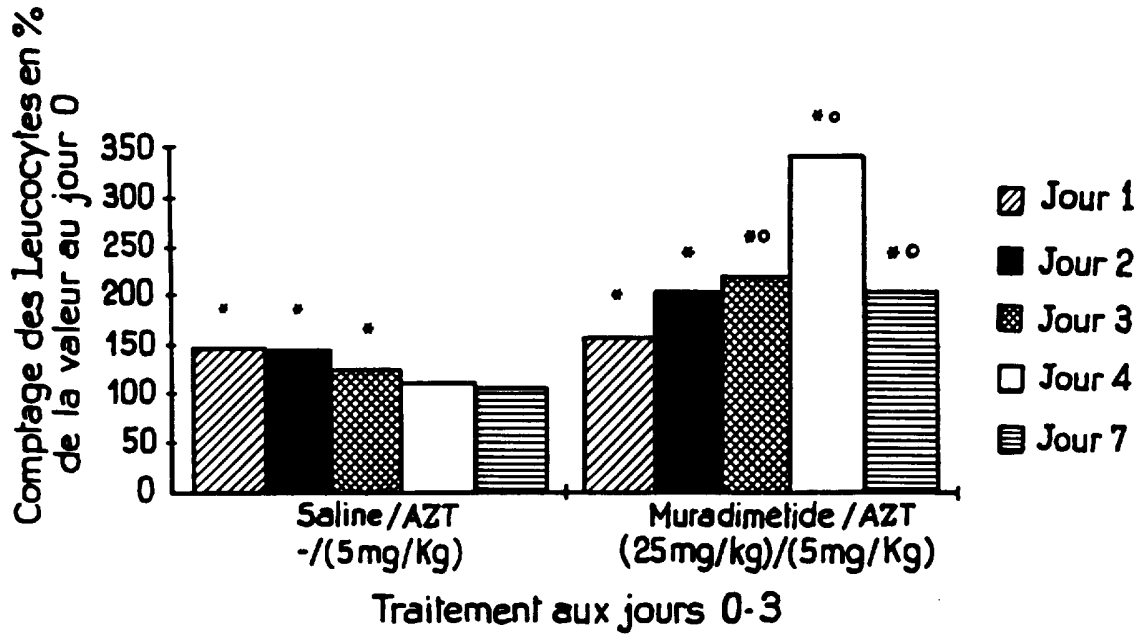


FIG.1A

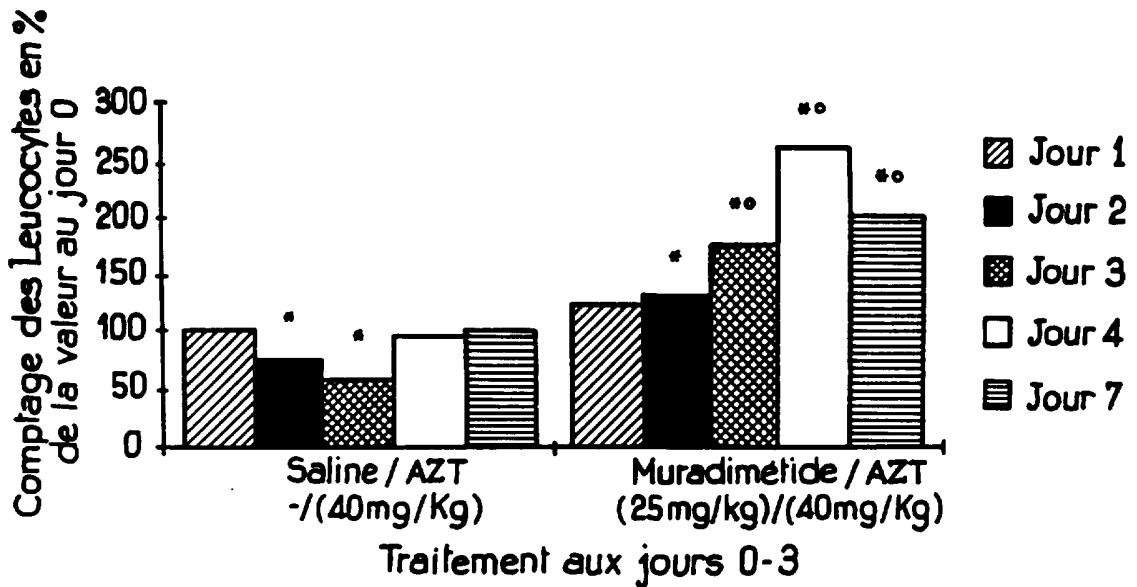


FIG.1B

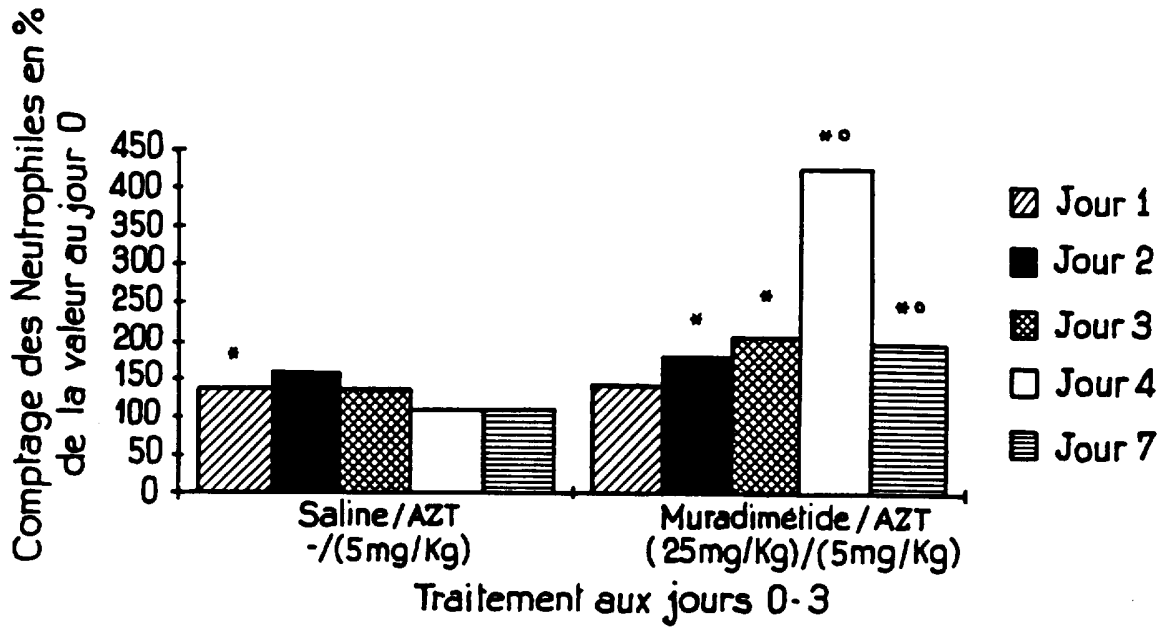


FIG. 2A

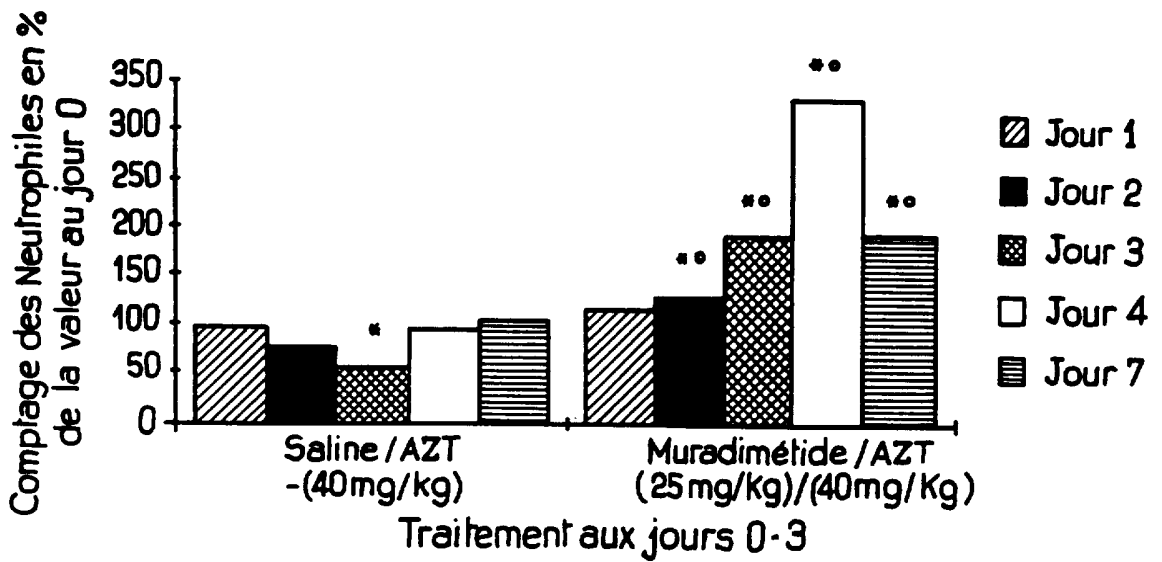


FIG. 2B

3 / 10

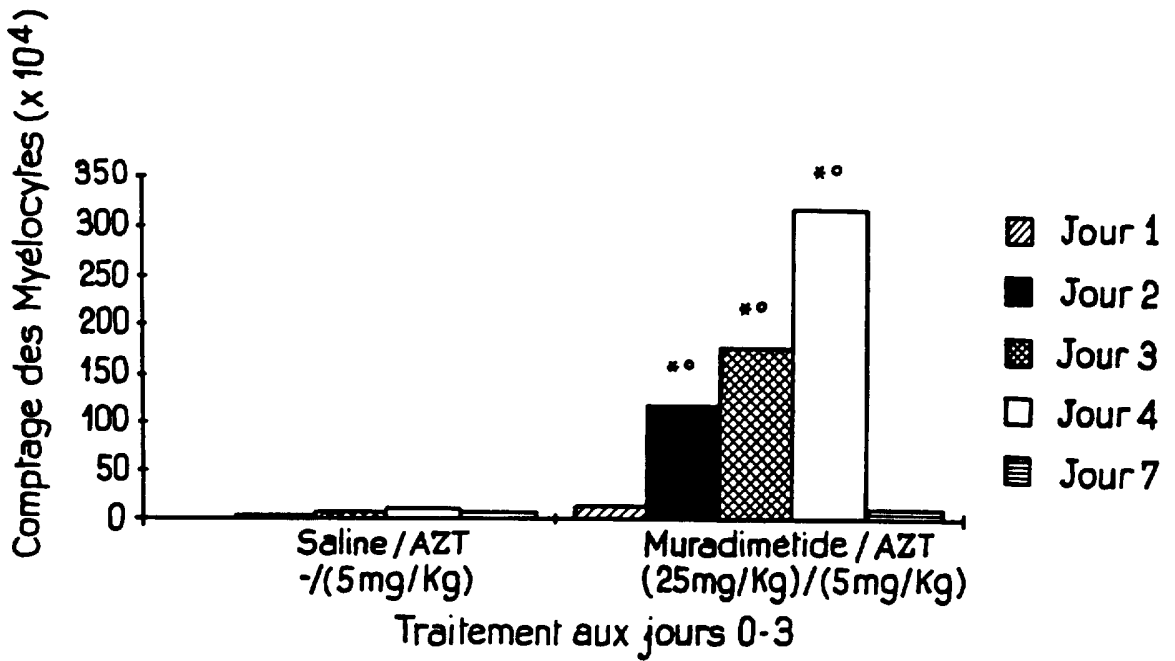


FIG. 3A

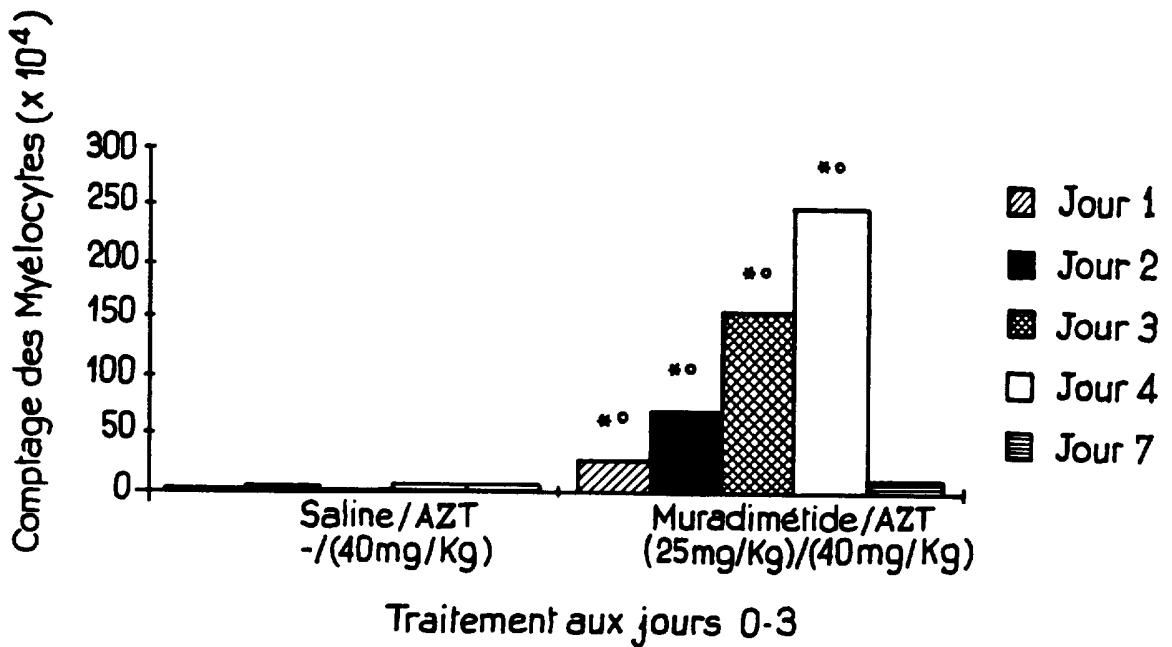


FIG. 3B

4 / 10

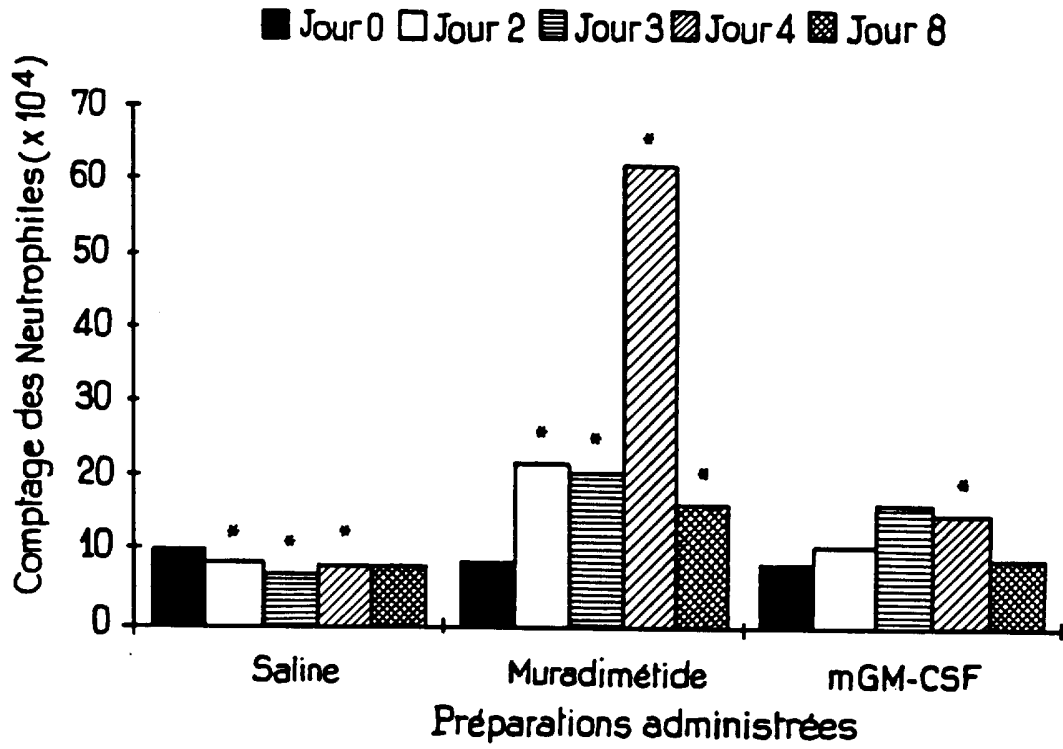


FIG. 4

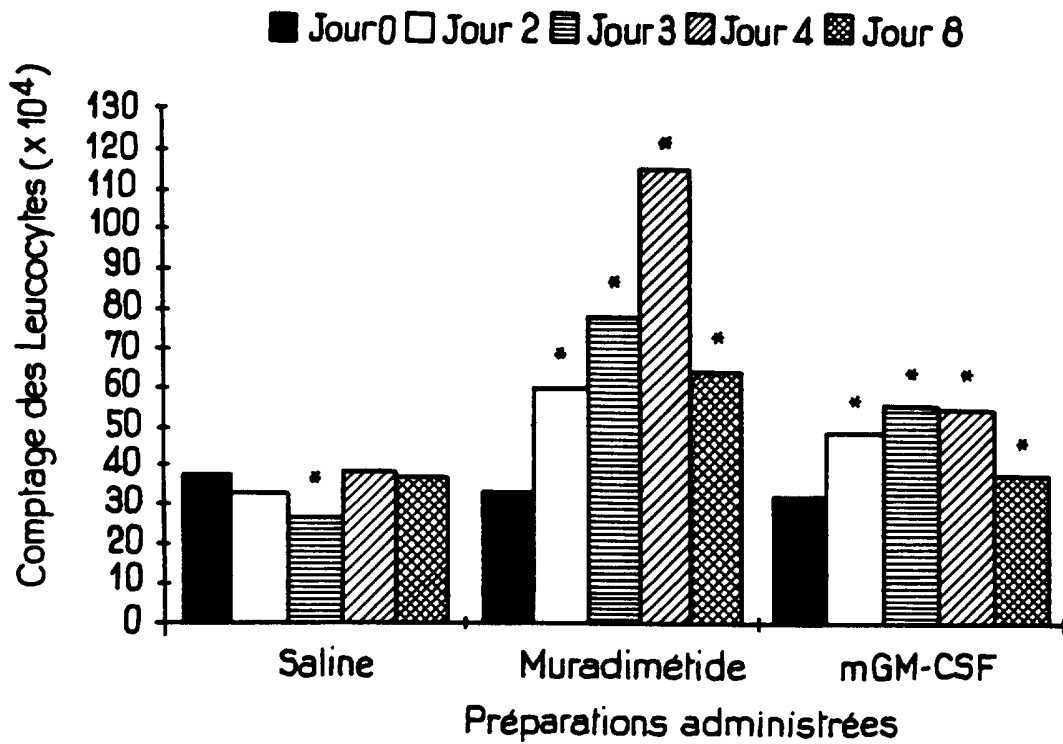


FIG. 5

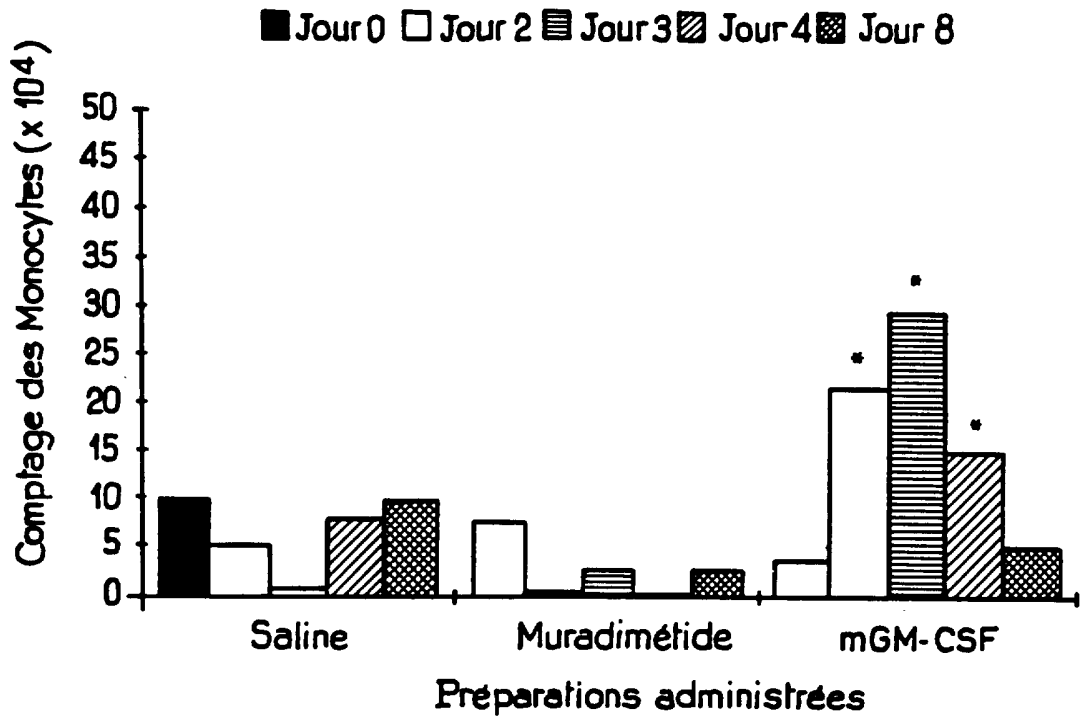


FIG. 6

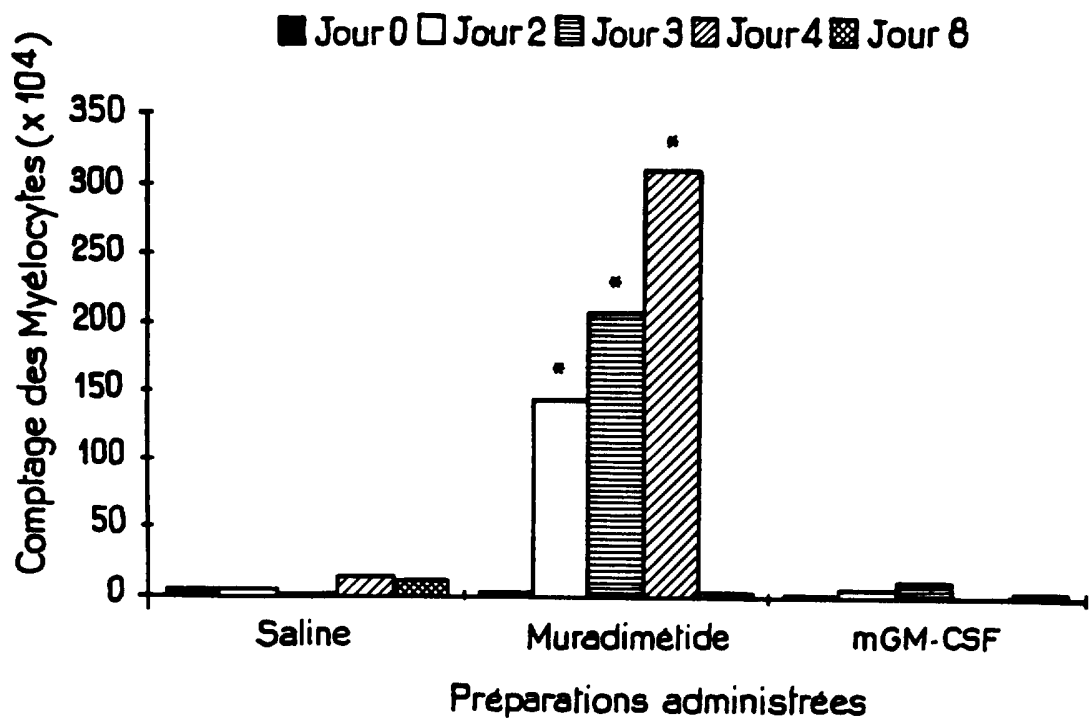


FIG. 7

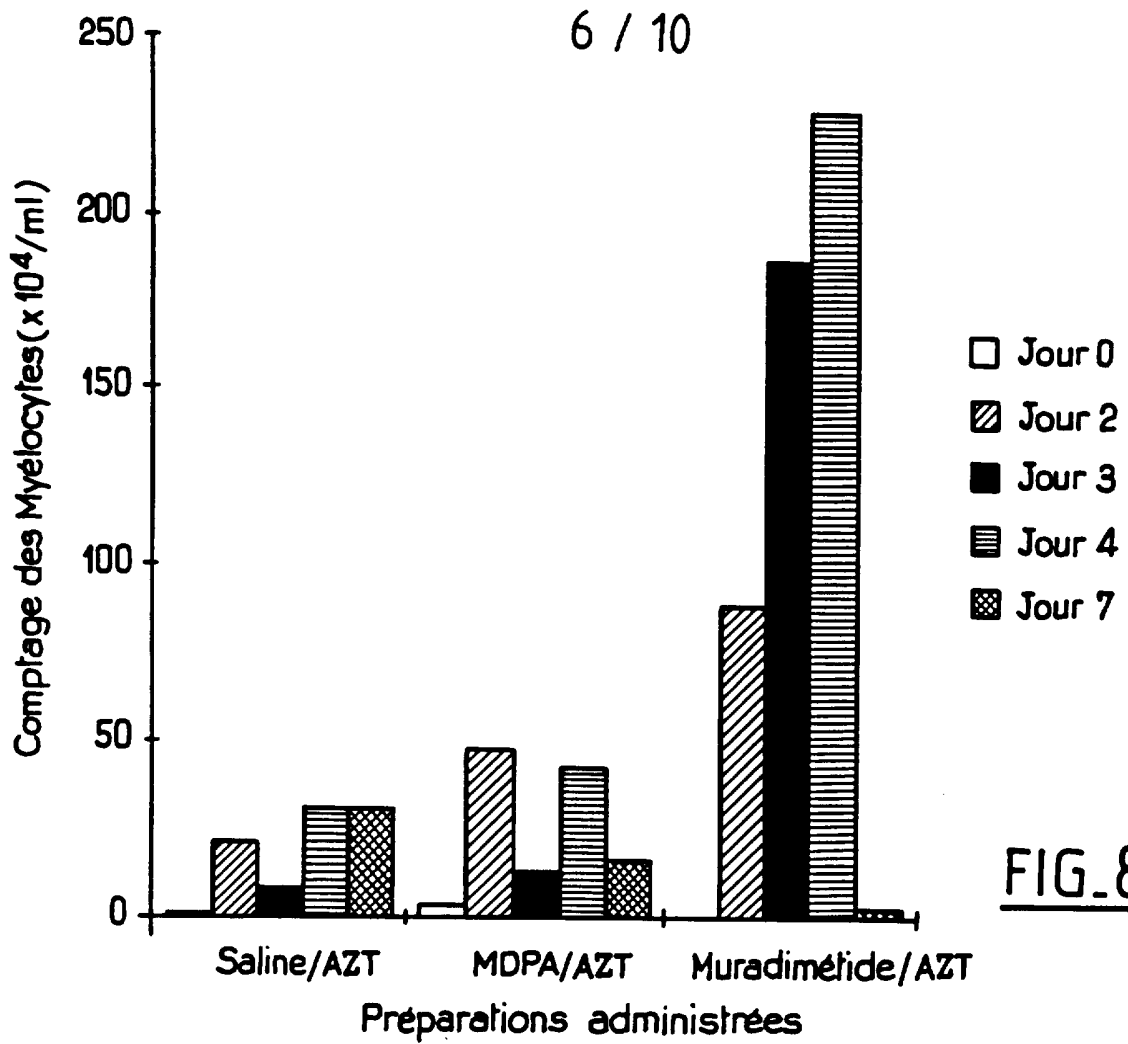


FIG. 8

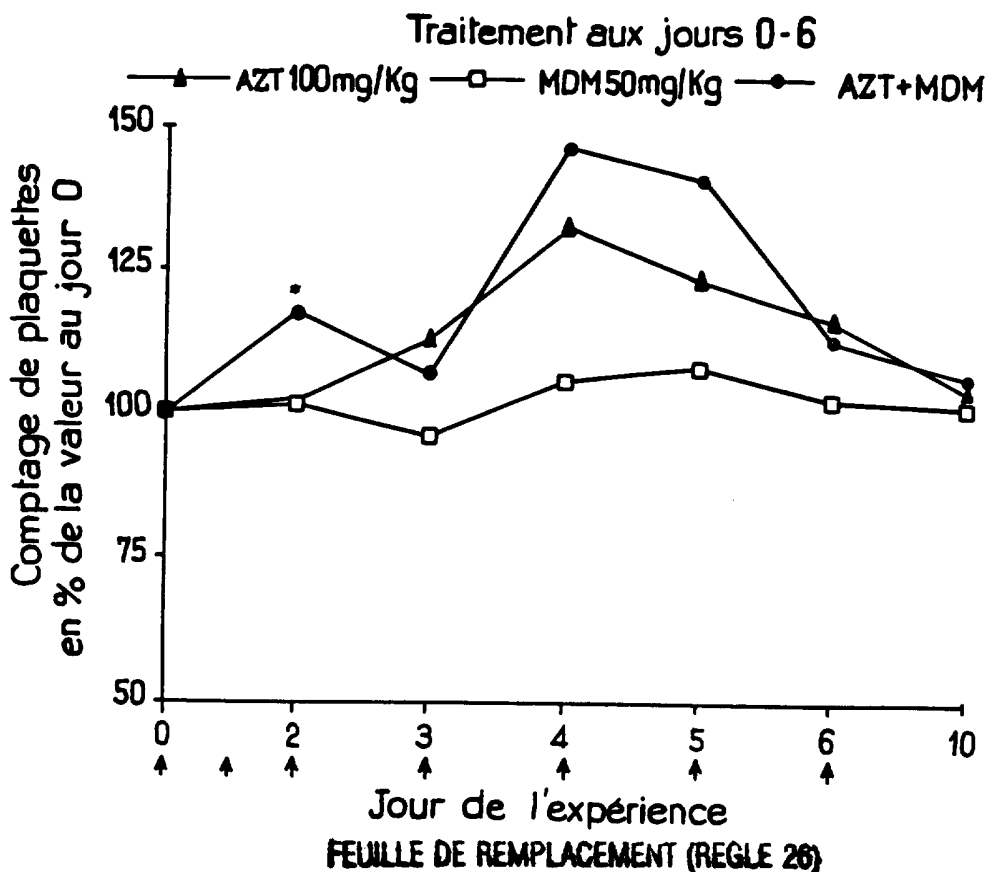
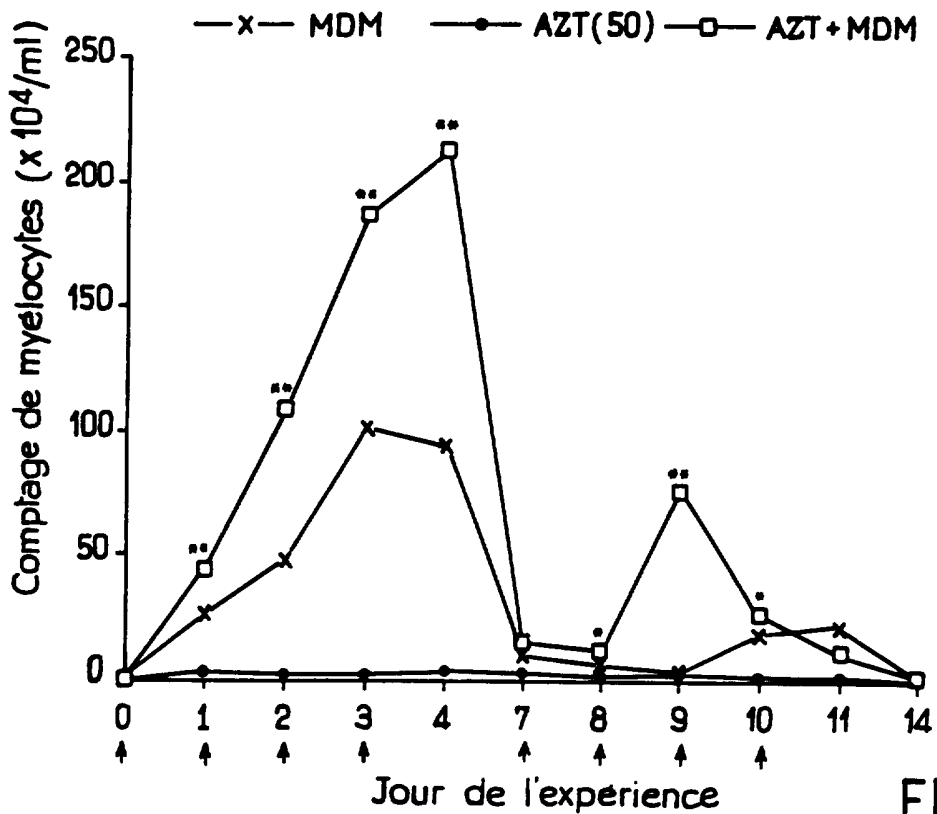
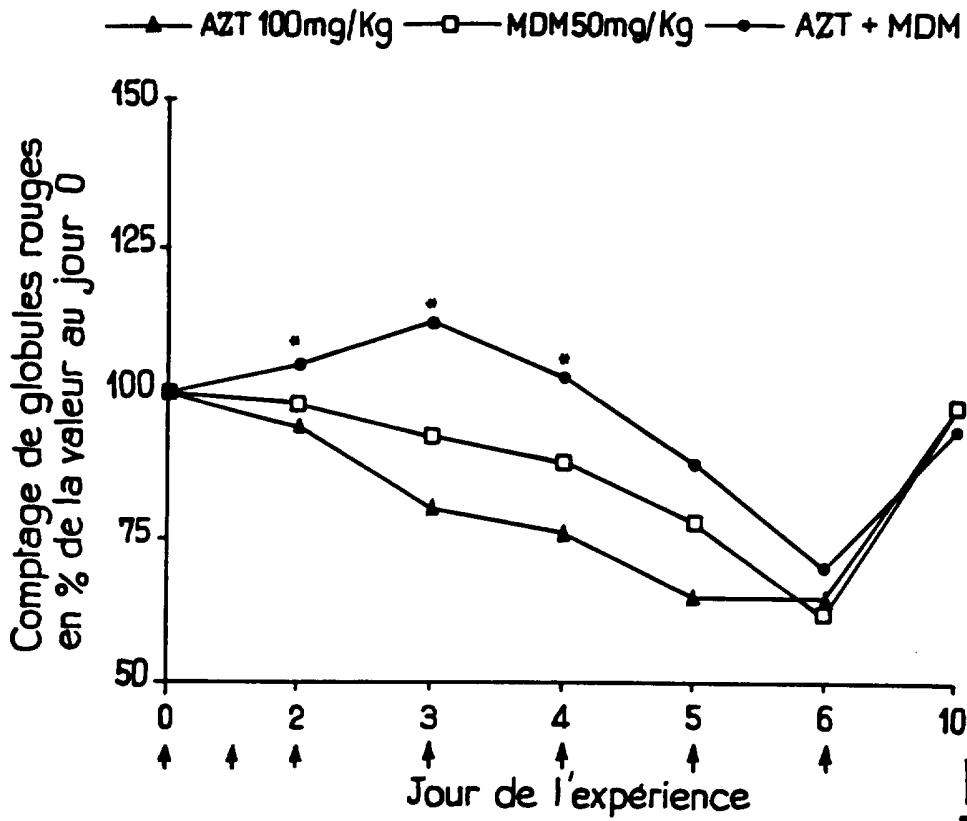


FIG. 9

7 / 10

Traitement aux jours 0-6



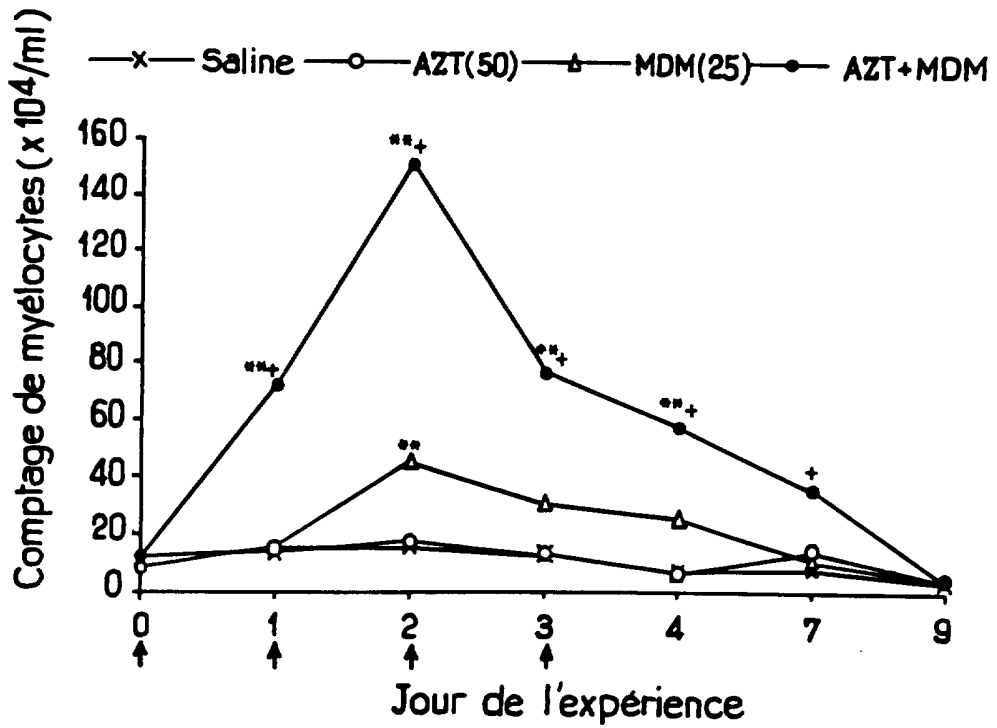


FIG. 12

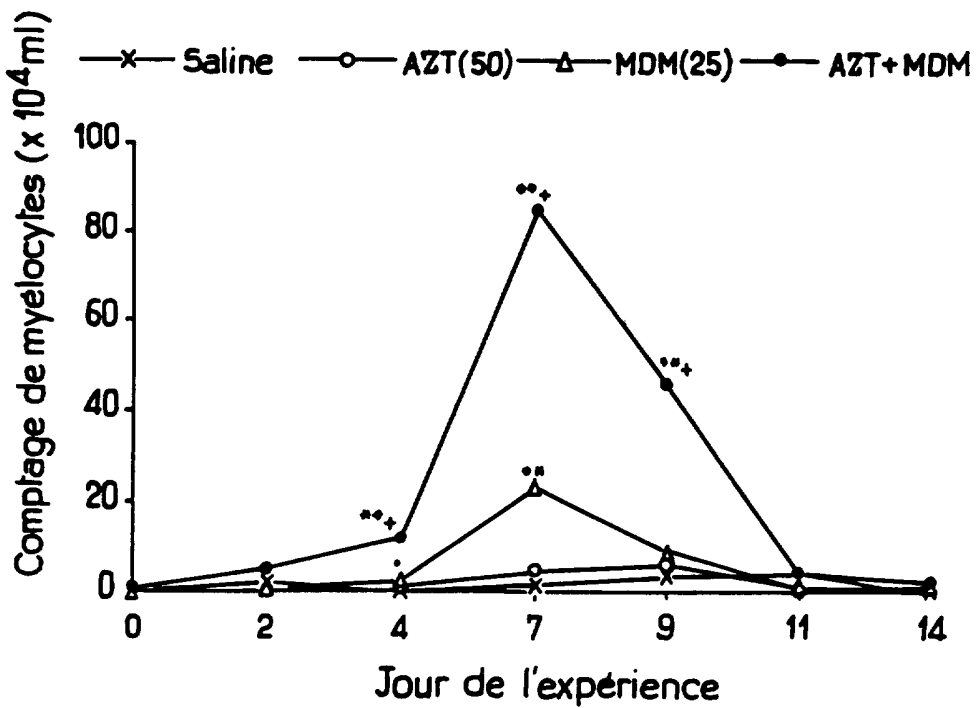


FIG. 13

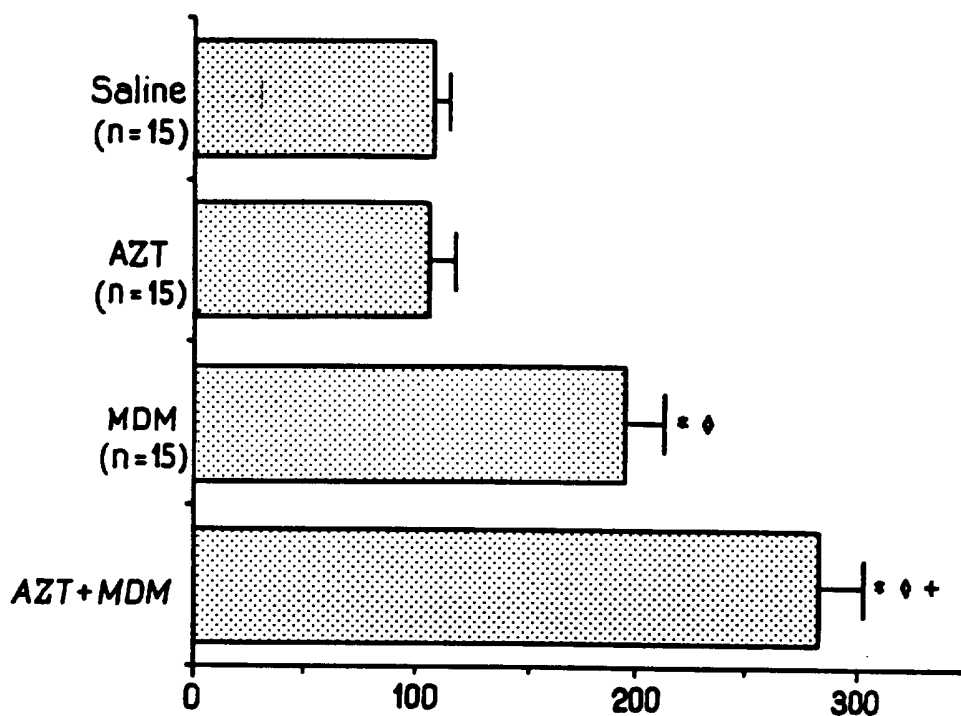


FIG.14a

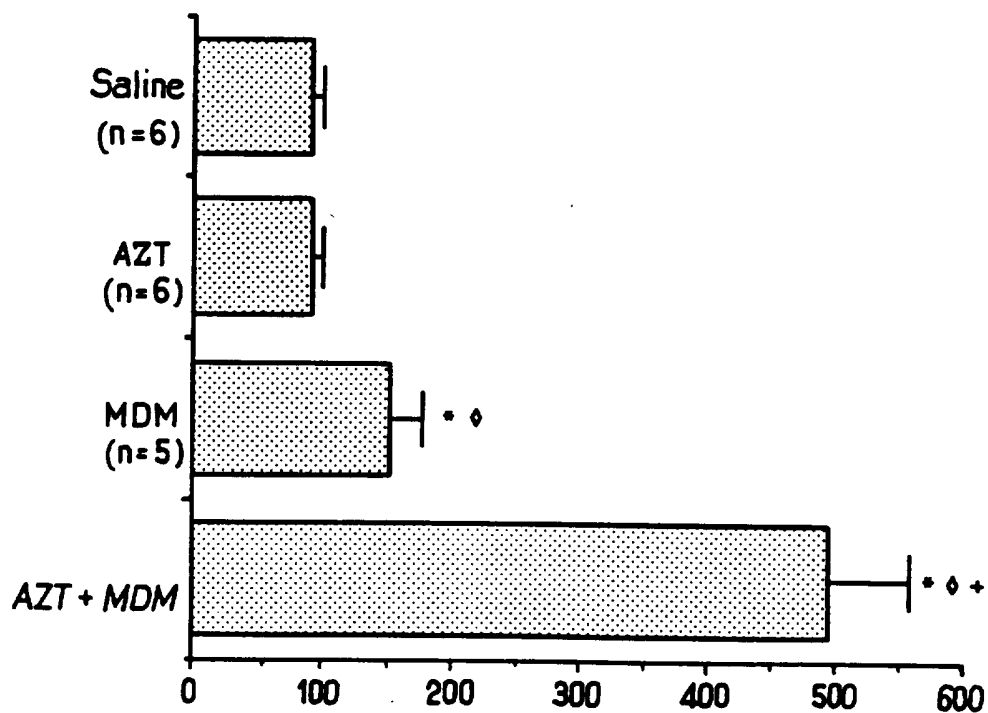


FIG.14b

10 / 10

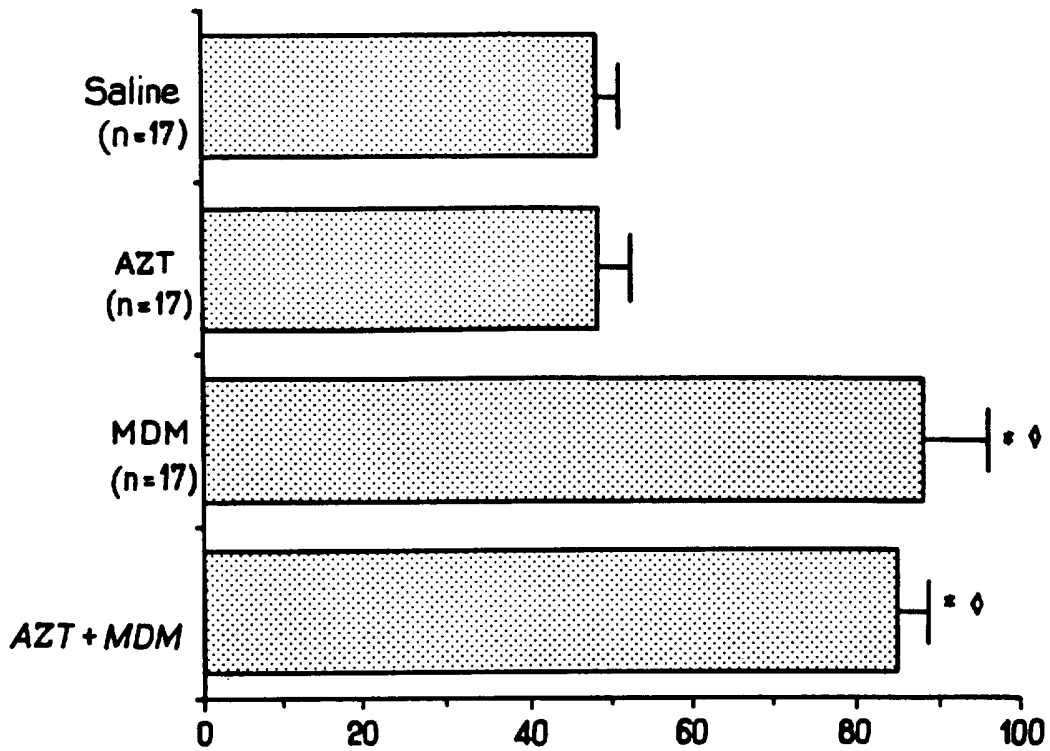


FIG.14c

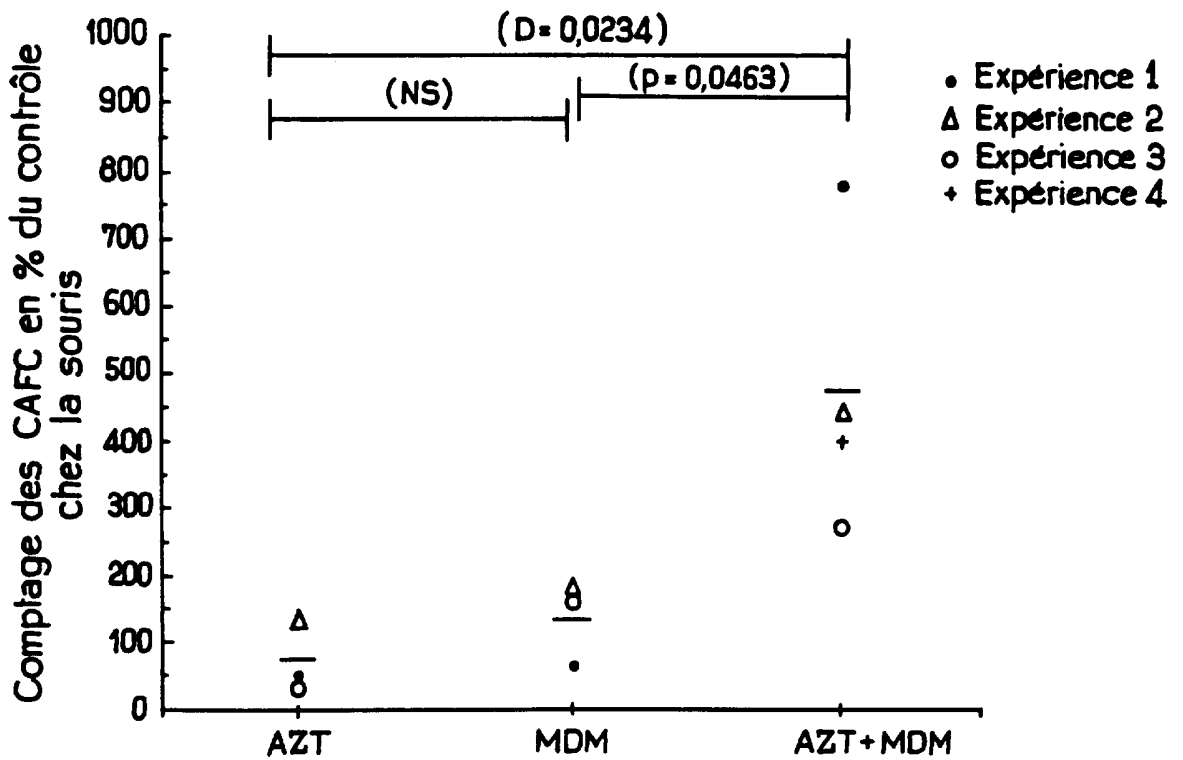


FIG.14d

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PLI/FR 96/00527

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C07K9/00 A61K47/18

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K A61K

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR,A,2 343 483 (ANVAR) 7 October 1977 see the whole document ---	1-5, 18-21
X	INT. CONGR. SER. EXCERPTA MEDICA, vol. 563, 1982, pages 137-240, XP002008784 compound No. 16 of table No.1 ---	1-5, 18-21
X	CARBOHYDRATE RESEARCH, vol. 81, no. 1, 1981, AMSTERDAM NL, pages 173-176, XP002008785 T D J HALLS ET AL.: "The anomeric configuration of the immunostimulant N-acetylmuramoyl-dipeptide and some of its derivatives" compound b in page 173 ---	1-5, 18-21
	-/--	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 July 1996

Date of mailing of the international search report

29-07-96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 96/00527

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 099 578 (CIBA-GEIGY AG) 1 February 1984 fourth compound of example 2 ---	1-5, 18-21
A	EP,A,0 192 609 (CIBA-GEIGY AG) 27 August 1986 see the whole document ---	1-5, 18-21
A	EP,A,0 089 290 (ANVAR) 21 September 1983 see the whole document ---	1-5, 18-21
P,X	WO,A,95 19777 (VACSYN, S. A.) 27 July 1995 see the whole document -----	1-27

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/FR 96/00527

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2343483	07-10-77	AU-B- 516843	25-06-81
		AU-B- 2299277	14-09-78
		BE-A- 852349	12-09-77
		CA-A- 1098515	31-03-81
		CH-A- 619469	30-09-80
		DE-A- 2710454	22-09-77
		GB-A- 1573126	13-08-80
		JP-C- 1417112	22-12-87
		JP-A- 52139018	19-11-77
		JP-B- 62025679	04-06-87
		NL-A- 7702579	13-09-77
US-A- 4153684	08-05-79		

EP-A-99578	01-02-84	AU-B- 555418	25-09-86
		AU-B- 1721883	26-01-84
		CA-A- 1243305	18-10-88
		JP-A- 59033296	23-02-84
		SU-A- 1299516	23-03-87
		US-A- 4548923	22-10-85

EP-A-192609	27-08-86	AU-B- 579448	24-11-88
		AU-B- 5376786	28-08-86
		AU-B- 597571	07-06-90
		AU-B- 5376886	28-08-86
		EP-A- 0192611	27-08-86
		JP-A- 61194099	28-08-86
		JP-A- 61194037	28-08-86

EP-A-89290	21-09-83	FR-A- 2522967	16-09-83
		AU-B- 570405	17-03-88
		AU-B- 1248583	22-09-83
		CA-A- 1193216	10-09-85
		JP-B- 7020882	08-03-95
		JP-A- 58208237	03-12-83
		SU-A- 1331433	15-08-87
		US-A- 4639512	27-01-87

WO-A-9519777	27-07-95	FR-A- 2715305	28-07-95
		AU-B- 1580995	08-08-95

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dr de Internationale No
PCT/FR 96/00527

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C07K9/00 A61K47/18

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR,A,2 343 483 (ANVAR) 7 Octobre 1977 voir le document en entier ---	1-5, 18-21
X	INT. CONGR. SER. EXCERPTA MEDICA, vol. 563, 1982, pages 137-240, XP002008784 *compose no. 16 de la table no. 1* ---	1-5, 18-21
X	CARBOHYDRATE RESEARCH, vol. 81, no. 1, 1981, AMSTERDAM NL, pages 173-176, XP002008785 T D J HALLS ET AL.: "The anomeric configuration of the immunostimulant N-acetylmuramoyl-dipeptide and some of its derivatives" *composé b à la page 173* --- -/--	1-5, 18-21

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

18 Juillet 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

29-07-96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Masturzo, P

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. de Internationale No
PCT/FR 96/00527

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP,A,0 099 578 (CIBA-GEIGY AG) 1 Février 1984 *quatrième composé de l'exemple 2* ---	1-5, 18-21
A	EP,A,0 192 609 (CIBA-GEIGY AG) 27 Août 1986 voir le document en entier ---	1-5, 18-21
A	EP,A,0 089 290 (ANVAR) 21 Septembre 1983 voir le document en entier ---	1-5, 18-21
P,X	WO,A,95 19777 (VACSYN, S. A.) 27 Juillet 1995 voir le document en entier -----	1-27

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De de Internationale No
PCT/FR 96/00527

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A-2343483	07-10-77	AU-B- 516843	25-06-81
		AU-B- 2299277	14-09-78
		BE-A- 852349	12-09-77
		CA-A- 1098515	31-03-81
		CH-A- 619469	30-09-80
		DE-A- 2710454	22-09-77
		GB-A- 1573126	13-08-80
		JP-C- 1417112	22-12-87
		JP-A- 52139018	19-11-77
		JP-B- 62025679	04-06-87
		NL-A- 7702579	13-09-77
		US-A- 4153684	08-05-79
EP-A-99578	01-02-84	AU-B- 555418	25-09-86
		AU-B- 1721883	26-01-84
		CA-A- 1243305	18-10-88
		JP-A- 59033296	23-02-84
		SU-A- 1299516	23-03-87
		US-A- 4548923	22-10-85
EP-A-192609	27-08-86	AU-B- 579448	24-11-88
		AU-B- 5376786	28-08-86
		AU-B- 597571	07-06-90
		AU-B- 5376886	28-08-86
		EP-A- 0192611	27-08-86
		JP-A- 61194099	28-08-86
		JP-A- 61194037	28-08-86
EP-A-89290	21-09-83	FR-A- 2522967	16-09-83
		AU-B- 570405	17-03-88
		AU-B- 1248583	22-09-83
		CA-A- 1193216	10-09-85
		JP-B- 7020882	08-03-95
		JP-A- 58208237	03-12-83
		SU-A- 1331433	15-08-87
		US-A- 4639512	27-01-87
WO-A-9519777	27-07-95	FR-A- 2715305	28-07-95
		AU-B- 1580995	08-08-95